

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E
CITOTÓXICA *in vitro* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
PLANTAS NATIVAS DO CERRADO BRASILEIRO**

Autora: Silvânia de Sousa Silva
Orientadora: Dra. Cristiane de Melo Cazal

**Rio Verde – GO
Fevereiro – 2015**

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E
CITOTÓXICA *in vitro* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
PLANTAS NATIVAS DO CERRADO BRASILEIRO**

Autora: Silvânia de Sousa Silva
Orientadora: Dra. Cristiane de Melo Cazal

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de concentração Agroquímica.

**Rio Verde - GO
Fevereiro – 2015**

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E
CITOTÓXICA *in vitro* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
PLANTAS NATIVAS DO CERRADO BRASILEIRO**

Autora: Silvânia de Sousa Silva
Orientadora: Dra. Cristiane de Melo Cazal

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica

APROVADA em 27 de fevereiro de 2015.

Prof. Dra. Viviane Rodrigues Esperandim Sampaio
Avaliadora externa
UNIFRAN/Franca-SP

Prof. Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves
Avaliadora interna
IF Goiano/Rio Verde

Prof. Dra. Cristiane de Melo Cazal
Presidente da banca
IF Goiano/Iporá

**Rio Verde – GO
Fevereiro – 2015**

A Deus , senhor da minha vida;

Aos meus filhos amados Davi e Daniel, razões da minha vida;

Às minhas irmãs Erivânia e Reivânia e ao meu cunhado Milton Junior por todo apoio;

Aos meus sobrinhos Victor, Vitória e Ana Luísa, os quais amo muito;

À vizinha do meu coração Raimunda;

À memória dos meus pais Valdirino e Neusa e meu irmão Sebastião, que foram para junto do Pai.

Com amor.

Esta dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, lugar que eu desejo que Ele esteja em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora Cristiane, por ter confiado e acreditado em mim para realização desse trabalho. Por todo seu ensinamento, amizade, respeito, dedicação. Pessoa que admiro e me inspira em todos os aspectos da vida.

Aos meus filhos Davi e Daniel por todo amor, carinho e compreensão, mesmo tendo que me ausentar por alguns períodos para realização desse trabalho.

Às minhas irmãs Erivânia e Reivânia e meu cunhado Milton Junior por todo apoio, principalmente financeiro, sem a qual não poderia me dedicar exclusivamente a esse trabalho.

Aos meus amigos Walter e Wmayma, por toda amizade, compreensão e cuidados com meus filhos em meus períodos de ausência.

À professora Cássia Cristina Fernandes por ter aceitado me coorientar.

À minha amiga de curso Marília por todas as experiências juntas vividas ao longo desse trabalho.

À minha amiga, companheira e aluna de iniciação científica no desenvolvimento desse trabalho, Raiane.

À toda equipe do Laboratório de Química Orgânica do Instituto Federal Goiano-Campus Iporá orientada pela professora Cristiane: Marcela, Géssica Carla, Eliângela, Lidiane e Naara, por toda ajuda com esse trabalho.

À professora Vânia por toda sua ajuda na identificação e localização das plantas pesquisadas.

À equipe do Laboratório de Parasitologia da UNIFRAN, professora Viviane, Daniele, Maria Gabriela, Ana e Mariana pela grande ajuda com os ensaios biológicos.

À Vanessa, Carla e o professor João do laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de São Carlos-SP pela colaboração com as análises dos compostos químicos.

À minha amiga Rita por seu apoio e hospedagem na cidade de Franca-SP.

À FAPEG pela concessão da bolsa de estudo, muito importante para o desenvolvimento desse trabalho.

À toda equipe do Departamento de Pós graduação e Programa de Pós Graduação em Agroquímica, especialmente ao professor Adriano e Pâmela, que me auxiliaram sempre que necessitei.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Agroquímica.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente com este trabalho.

Muito obrigada!!!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Silvânia de Sousa Silva, natural de Goiânia-GO Brasil, Filha de Valdivino Eurípedes da Silva e Neusa de Sousa Silva, graduada em Ciências Biológica pela Universidade Estadual de Goiás – Unidade Universitária de Iporá - GO. Mestre em Agroquímica pelo Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia Goiano.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURA.....	x
ÍNDICE DE EQUAÇÃO.....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRAT.....	xvii
1.INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Doença de Chagas.....	03
2.1.1 Agente Etiológico - <i>Trypanosoma cruzi</i>	03
2.1.2 Sintomas da Doença Chagas.....	05
2.1.3 Tratamento da Doença de Chagas.....	05
2.2 Óleos essenciais.....	06
2.3 Plantas estudadas.....	08
2.3.1 <i>Xylopia aromatica</i> (Annonaceae).....	08
2.3.2 <i>Kielmeyera coriacea</i> (Clusiaceae).....	10
2.3.3 <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> (Rutaceae).....	12
2.3.4 <i>Zanthoxylum riedelianum</i> (Rutaceae).....	13
3.OBJETIVO.....	15
4. METODOLOGIA.....	16
4.1 Coleta do material vegetal.....	16
4.2 Obtenção dos óleos essenciais.....	16
4.3 Análise química do óleo essencial.....	17
4.4 Avaliação da atividade tripanocida in vitro dos óleos essenciais.....	18
4.4.1. Obtenção das formas tripomastigotas (parasitas).....	18

4.4.2 Ensaio sobre as formas tripomastigotas <i>in vitro</i>	19
4.5 Avaliação da atividade citotóxica. dos óleos essenciais.....	19
4.6 Normas Éticas.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1. Teor e aspecto físico dos óleos essenciais extraídos.....	22
5.2. Análises químicas dos óleos essenciais.....	23
5.2.1 Análises químicas dos óleos essenciais dos frutos <i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart. (Annonaceae).....	23
5.2.2 Análises químicas dos óleos essenciais dos frutos <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam. (Rutaceae).....	26
5.2.3 Análises químicas dos óleos essenciais das folhas de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam. (Rutaceae).....	29
5.2.4 Análises químicas dos óleos essenciais das folhas <i>Zanthoxylum riedelianum</i> Lam. (Rutaceae).....	33
5.2.5 Análises químicas dos óleos essenciais das folhas <i>Kielmeyera coriacea</i>	36
5.3 Avaliação da atividade tripanocida.....	40
5.4 Avaliação da atividade citotóxica.....	43
6.CONCLUSÃO.....	45
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Cor e teor dos óleos essenciais extraídos.....	22
Tabela 2: Constituintes químicos do óleo essencial dos frutos <i>Xilopia aromatica</i> (Lam.) Mart. (Annonaceae).....	25
Tabela 3: Constituintes químicos do óleo essencial dos frutos de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam. (Rutaceae).....	29
Tabela 4: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam. (Rutaceae).....	32
Tabela 5: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>Zanthoxylum riedelianum</i> Lam. (Rutaceae).....	35
Tabela 6: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart & Zucc.....	39
Tabela 7: Porcentagem de lise das tripomastigotas e concentração de inibição (IC ₅₀) dos óleos essenciais.....	41
Tabela 8: Avaliação da atividade citotóxica dos óleos essenciais.....	43
Tabela 9: Atividade tripanocida e citotóxica* e índice de seletividade dos óleos essenciais de <i>kielmeyera coriácea</i> , <i>Xilopia aromática</i> , <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> e <i>Zanthoxylum riedelianum</i>	44

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1: Ciclo reprodutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	04
Figura 2: Folhas e frutos de <i>Xylopia aromatica</i>	09
Figura 3: Folhas de <i>kielmeyera coriacea</i>	11
Figura 4: Folhas e frutos de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	12
Figura 5: Galhos e folhas de <i>Zanthoxylum riedelianum</i>	13
Figura 6: Placa de microtitulação de 96 poços com formas tripomastigotas e óleo essencial em análise (A); Câmara de Neubauer (B).....	19
Figura 7: Placa de microtitulação de 96 poços com óleo essencial em análise adicionado a fibroblastos da linhagem LLCMK ₂ (A); Placa de microtitulação de 96 no leitor de ELISA em técnica colorimétrica pelo MTT (B).....	20
Figura 8: Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial dos frutos <i>Xylopia aromatica</i> : A- α -thujeno; B- α -pineno; C- sabineno.....	23
Figura 9- Cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial dos frutos de <i>Xilopia aromatica</i> . Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min.....	24
Figura 10- Ampliação do Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial dos frutos de <i>Xilopia aromatica</i> . Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0	24

- min.....
- Figura 11- Cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial dos frutos de *Zanthoxylum rhoifolium*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min..... 26
- Figura 12- Ampliação do cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial dos frutos de *Zanthoxylum rhoifolium*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min..... 27
- Figura 13: Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial dos frutos de *Zanthoxylum rhoifolium*: A- α -thujeno; B- α -pineno; C- sabineno..... 27
- Figura 14- Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min..... 30
- Figura 15- Ampliação do Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min..... 30
- Figura 16: Estrutura química dos compostos majoritário óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium*: A- Bicyclogermacreno ; B- δ -elemeno; C- β -cedreno; D- β -elemeno; E- β -cariofileno..... 31
- Figura 17- Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum riedelianum*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min..... 33
- Figura 18- Ampliação do Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum riedelianum*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 50 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min..... 34

Figura 19: Estrutura química dos compostos majoritário do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum riedelianum*: A- fitol; B- γ -elemeno 34

Figura 20: Estrutura química dos compostos majoritário do óleo essencial das folhas de *Kielmeyera coriacea*: A- δ -amorfenol; B- n-tetradecano; C- cariofileno..... 37

Figura 21- Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial das folhas de *Kielmeyera coriacea*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min..... 37

Figura 22- Ampliação do Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial das folhas de *Kielmeyera coriacea*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min..... 38

ÍNDICE DE EQUAÇÃO

Equação 1: Equação de Van den Dool e Kratz	18
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância e Inspeção Sanitária

GC-MS - cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa

CCD – cromatografia de camada delgada

DC - doença de Chagas

DTNs - doenças tropicais negligenciadas

DMSO - dimetil sulfóxido

ICC - insuficiência cardíaca congestiva

IK- índice kováts

LLCMK₂ - linhagem secundária de células de rim de macaco

n - o menor número de átomos de carbono da série de n-alcanos

N - o maior número de átomos de carbono da série de n-alcanos

RPMI - Roswell Park Memorial Institutetr

RESUMO

SILVA, SILVÂNIA DE SOUSA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde – GO, fevereiro de 2015. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E CITOTÓXICA *in vitro* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO BRASILEIRO.** Orientadora: Cristiane de Melo Casal. Coorientadora: Cássia Cristina Fernandes Alves.

Uma das principais doenças tropicais negligenciadas é a doença de Chagas (DC), causada pelo *Trypanosoma cruzi*. No Brasil, a região de alta prevalência da doença abrange uma área que vai do Maranhão até o Rio Grande de Sul. O tratamento da DC é feito normalmente com os antiparasitários Benzonidazol e Nifurtimox que possui diversos efeitos colaterais. O mercado de produtos naturais vem crescendo a cada ano e a utilização de plantas tem se destacado como alternativa para desenvolvimento de novos medicamentos para cura dessa doença. Neste contexto o presente trabalho descreve o estudo químico dos óleos essenciais das folhas de *Zanthoxylum riedelianum*, *Zanthoxylum rhoifolium* e *Kielmeyera coriacea* e dos frutos da *Xylopia aromatica* e *Zanthoxylum rhoifolium*, bem como a capacidade tripanocida e efeitos citotóxicos dos mesmos. O material vegetal foi coletado no município de Iporá-GO e submetidos à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger para obtenção dos óleos essenciais. As análises químicas dos óleos foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado em espectrômetro de massas. Para a realização do ensaio da atividade tripanocida formas tripomastigotas foram adicionados em placa de microtitulação de 96 poços e posteriormente adicionados os óleos essenciais e após 24 horas de incubação, foi realizada a verificação da atividade biológica através da quantificação direta dos parasitas vivos em câmara de Neubauer levando em consideração a motilidade flagelar dos protozoários. Para a avaliação da atividade citotóxica fibroblastos da linhagem LLCMK₂ foram adicionados em placa de microtitulação de 96 poços e posteriormente adicionados os óleos essenciais e após 24 horas de incubação fez-se a verificação de células viáveis através do método MTT. Os óleos essenciais que apresentaram melhores atividade tripanocida foram os das folhas *Kielmeyera coriacea* (IC₅₀ 6,4 µg mL⁻¹) e frutos *Xylopia aromatica* (IC₅₀ 6,4 µg mL⁻¹), seguidos pelo óleo dos frutos *Zanthoxylum*

rhoifolium (IC_{50} 8,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os óleos essenciais das folhas *Zanthoxylum riedelianum* (IC_{50} 13,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), folhas *Zanthoxylum rhoifolium* (IC_{50} 29,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) também apresentaram ótima atividade mesmo possuindo valores de concentrações inibitórias mais elevadas quando comparados com o controle positivo benzonidazol (IC_{50} 9,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Todos os óleos essenciais apresentaram toxicidade contra células LLCMK₂ em concentrações maiores que 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo assim considerados de baixa citotoxicidade. Desta forma podemos considerar todos os óleos essenciais excelentes candidatos para investigação de nova droga antiparasitária.

PALAVRAS CHAVE: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, óleo essencial, antiparasitário.

ABSTRAT

Chagas disease (CD) is a major neglected tropical disease that is caused by *Trypanosoma cruzi*. In Brazil, a high prevalence of the disease is observed in the geographic area reaching from the state of Maranhão to Rio Grande do Sul. CD is usually treated with the antiparasitic drugs benznidazole and nifurtimox, which have several side effects. The market for natural products has grown considerably, and the use of plants has emerged as an alternative for the development of novel drugs to cure this disease. In this context, this study describes the chemical analysis of the essential oils from the leaves of *Zanthoxylum riedelianum*, *Zanthoxylum rhoifolium*, and *Kielmeyera coriacea* and the fruits of *Xylopia aromatica* and *Zanthoxylum rhoifolium* as well as the trypanocidal and cytotoxic activities of these compounds. The plant material was collected in the municipality of Iporá, state of Goiás, and was subjected to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus for extraction of the essential oils. The chemical analysis of the oils was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. To perform the trypanocidal activity assay, trypomastigotes were added to a 96-well microtiter plate followed by the addition of the essential oils. After a 24-h incubation period, the biological activity was assessed through the direct quantitation of live parasites in a Neubauer chamber by observing the flagellar motility of the protozoa. For evaluation of the cytotoxic activity, fibroblasts of the LLCMK₂ cell line were added to a 96-well microtiter plate, followed by the addition of the essential oils. After a 24-h incubation period, the viable cells were assessed using the MTT method. The essential oils with the strongest trypanocidal activity were those from the leaves of *Kielmeyera coriacea* (IC₅₀ of 6.4 µg mL⁻¹) and the fruits of *Xylopia aromatica* (IC₅₀ of 6.4 µg mL⁻¹), followed by those from the fruits of *Zanthoxylum rhoifolium* (IC₅₀ of 8.1 µg mL⁻¹). The essential oils from the leaves of *Zanthoxylum riedelianum* (IC₅₀ of 13.1 µg mL⁻¹) and *Zanthoxylum rhoifolium* (IC₅₀ of 29.5 µg mL⁻¹) also showed excellent activity, although their inhibitory concentration values were higher than those of the positive control, benznidazole (IC₅₀ of 9.8 µg mL⁻¹). All of the essential oils were toxic to LLCMK₂ cells at concentrations of >100 µg mL⁻¹ and, therefore, were considered to have low cytotoxicity. In conclusion, our results indicate that these essential oils are excellent candidates for the investigation of novel antiparasitic drugs.

KEYWORDS: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, essential oil, antiparasitic drugs.

1. INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são infecções debilitantes que afetam mais de um bilhão de pessoas no mundo. Populações desfavorecidas que vivem em áreas rurais remotas, favelas urbanas ou zonas de conflito de países subdesenvolvido ou em desenvolvimento, possuem maior risco de se infectarem com DTNs (MOREL, 2006; SCHMIDT *et al.*, 2012).

Uma das principais DTNs é a doença de Chagas (DC), descoberta e descrita por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (Carlos Chagas) em 1909. A DC humana é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado, que necessita de dois hospedeiros, triatomíneo (invertebrado) e mamífero (vertebrado), para completar seu ciclo evolutivo (REY, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Estima-se que 10 milhões de pessoas, na América latina, estejam contaminadas com a DC, havendo um acréscimo de mais de 40 mil novos casos anuais. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

No Brasil, a região de alta prevalência da DC humana abrange uma área de três milhões de quilômetros quadrados, desde o Maranhão até o Rio Grande de Sul. São cerca de 2.450 municípios, envolvendo mais de 28 milhões de pessoas expostas ao risco de contaminação (CIMERMA & CIMERMA, 2010; MARTINS-MELO *et al.*, 2012).

O tratamento da DC é feito com os antiparasitários Nifurtimox e Benznidazol com índices de cura de 60-80% na fase aguda da doença, sendo que no Brasil apenas o Benznidazol é liberado pela ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância e Inspeção Sanitária), uma vez que o nifurtimax possui diversos efeitos colaterais agressivos, debilitando muito o paciente (DIAS & DESSOY, 2009). Adicionalmente, a terapêutica da doença de Chagas continua parcialmente ineficaz apesar dos esforços de laboratórios e pesquisadores. Várias drogas têm sido testadas sem resultados positivos para a cura definitiva, devido a resistência natural de algumas cepas de parasitas (NEVES, 2011).

O mercado de produtos naturais, como extratos e óleos essenciais de plantas, vem crescendo a cada ano, e a utilização de plantas tem sido colocada como alternativa para desenvolvimento de novos medicamentos para cura desta doença tendo em vista o grande potencial de compostos antimicrobianos e antioxidantes (PRAKASH *et al.*, 2012.; VIUDA-MARTOS *et al.*, 2011). Recentemente pesquisas realizadas com o óleo essencial dos frutos de *Piper cubeba* em formas tripomastigotas e amastigotas, de *Trypanosoma cruzi in vitro* isoladas a partir de uma linhagem de cultura de células LLCMK2, se mostrou bastante eficaz (ESPERANDIM *et al.*, 2013). Trabalho realizado por Ferreira e colaboradores (2013), com substâncias isoladas a partir de extratos de espécies de *Miconia*, aplicadas em formas tripomastigotas, demonstrou eficaz atividade tripanocida.

O Cerrado tem se tornando um patrimônio natural brasileiro pela diversidade e endemismo das espécies biológicas, sendo uma importante fonte de novas substâncias naturais e óleos essenciais com diferentes atividades biológicas (PARRON *et al.*, 2008).

As espécies *Zanthoxylum riedelianum*, *Zanthoxylum rhoifolium* e *Kielmeyera coriacea* e *Xylopia aromatica*, são plantas existentes no cerrado brasileiro (LORENZE, 20014). Estudos comprovam que todas essas espécies apresentam atividades biológicas antiparasitárias (FACUNDO *et al.*, 2005; MESQUITA *et al.*, 2007; SOBRAL *et al.*, 2009; PEREIRA, 2010).

Os pesquisadores veem essa situação como um problema que afeta a saúde diretamente e causa grande impacto sócio econômico, aumentando a pobreza em um número considerável da população. Assim, esforços para encontrar uma droga eficaz que leve a cura definitiva dessa doença e a melhor qualidade de vida das pessoas por ela atingida cresce a cada ano (SCHMIDT *et al.*, 2012). Nesta perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo analisar a composição química dos óleos essenciais das folhas de *Zanthoxylum riedelianum*, *Zanthoxylum rhoifolium* e *Kielmeyera coriacea* e dos frutos da *Xylopia aromatica* e *Zanthoxylum rhoifolium*, bem como avaliar sua atividade tripanocida e atividade citotóxica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença de Chagas

2.1.1 Agente Etiológico - *Trypanosoma cruzi*

A Doença de Chagas é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma das 17 doenças tropicais negligenciadas do mundo (GUHL & RAMIREZ, 2013, MUNOZ-SARAVIA *et al.*, 2012). Conhecida também como tripanossomíase americana humana é uma antropozoonose (infecção transmitida ao homem por um reservatório animal) Os reservatórios naturais da DC são marsupiais e mamíferos placentários. A doença em humanos é resultado da invasão de estabelecimentos naturais de vetores por habitações humanas que estão em áreas endêmicas da doença por causa das condições sócio econômicas, em sua maioria zonas rurais (WHO, 2008).

A DC possui como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, que necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo evolutivo, um vertebrado (mamíferos) e um invertebrado (hemípteros hematófagos da família Reduvidae e subfamília Triatominae), que são insetos sugadores de sangue como *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e outras espécies conhecidas como barbeiros (REY, 2013).

O *Trypanosoma cruzi* é digenético com ampla distribuição na natureza, dotado de grande diversidade genética sendo agrupados, mediante ao perfil molecular em cepas. (SOUZA, 2000). As cepas se diferem genética, apresentando comportamento, morfologia, quadros clínicos, patogenicidade e parasitemia diferentes. Estudos sobre o comportamento biológico do *T. cruzi* e seus perfis histopatológicos em animais têm ajudado agrupar as cepas em tipos ou biodemas. (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

A transmissão pelo vetor (invertebrado/triatomíneo) é a que tem maior importância epidemiológica, ocorrendo quando o triatomíneo contrai o protozoário de espécies chamadas de reservatórios naturais como macaco, gambá e outros mamíferos placentários (desenvolvimento das crias se processa no interior do útero, onde o feto é

alimentado pela placenta), pela sucção do sangue dos mesmos. A infecção em humanos ocorre pela penetração do *Trypanosoma cruzi* na forma tripomastigota eliminada nas fezes ou na urina do vetor durante o hematofagismo (ingestão do sangue) em solução de continuidade da pele ou mucosa (DE SOUZA 1984, NEVES, 2011). Essa infecção também pode ser transmitida oralmente pela ingestão de alimentos como caldo de cana e açaí, transfusão de sangue, ou transmissão congênita (COURA, 2007).

O ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* (Figura 1) se perpetua através do triatomíneo vetor, que ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, ingeri também formas tripomastigotas do parasita que por sua vez irão transformar em epimastigotas, formas extracelulares replicadoras, no intestino médio do inseto. Já no intestino posterior essas formas vão se diferenciar para tripomastigotas metacíclicos infectantes, que serão depositadas juntamente com as fezes ou urina do inseto quando este se alimentar de outro mamífero (1). Estas formas do parasita entram no organismo do mamífero através da pele ferida e infligida pela picada do vetor ou pela mucosa permissiva ou membranas conjuntivas, podendo invadir praticamente qualquer célula nucleada (2). Dentro da célula ocorrerá a transformação das formas tripomastigotas metacíclicos para formas amastigotas, que irão se multiplicar por divisão binária simples longitudinal, e em seguida ocorrerá a diferenciação das formas amastigotas para formas tripomastigotas (3-4). Ao romperem a célula cairão na corrente circulatória e atingirão outras células de qualquer tecido ou órgão (5), assim podendo estar disponíveis para cumprir novo ciclo (6) (SCHMUNIS & YADON, 2010; TOSO *et al.*, 2011; NEVES, 2011;).

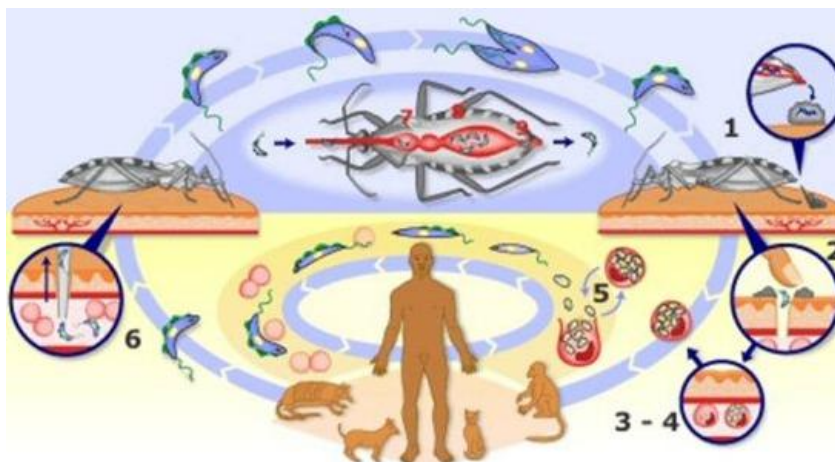


Figura 1: Ciclo reprodutivo do *Trypanosoma cruzi*

(<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/DoencadeChagas.php>, Acesso 14/01/2015)

2.1.2 Sintomas da DC

Na fase aguda da DC, ou seja, no início da infecção a quantidade de parasita é muito elevada, podendo até mesmo causar a morte do hospedeiro, principalmente se for criança (REY, 2013). A doença pode apresentar nesta fase sintomas como aparecimento de lesões dentro de 4-10 dias após a infecção e manifestações gerais como febre, edema localizado e generalizado, poliedemia, hepatomegalia, esplenomegalia, insuficiência cardíaca e perturbações nervosas, ou também pode ser assintomática (ausência de sintomas) (NEVES, 2011; REY, 20113). Caso o hospedeiro adquira resposta imune capaz de diminuir o número de parasitas e a intensidade da infecção, a doença passa para a fase Crônica. Esta fase se desenvolve lentamente após 10 a 15 anos de infecção do parasita (NEVES 2011).

Após permanecerem na fase crônica da doença por vários anos sem nenhum sintoma, os chagásicos, pessoas que possuem a DC, podem começar a apresentar sintomas relacionados com os sistemas cardiocirculatório e digestivo. Um dos principais sintomas é a insuficiência cardíaca congestiva (ICC), que é provocada pela destruição da massa muscular cardíaca pelo processo inflamatório de anos. Além da ICC fenômenos tromboembólicos são bem frequentes. Estes problemas podem evoluir clinicamente até a morte do chagásico (REY, 2013). No sistema digestivo surgem as alterações morfológicas como o megaesôfago, dilatação do esôfago, que provoca sintomas como disfagia, odinofagia, dor retroesternal, tosse, sialose e ainda megacólon, dilatações dos colos sigmoide e reto, provocando complicações como obstrução intestinal e peritonite (CIMERME & CIMERMA, 2010).

2.1.3 Tratamento da Doença de Chagas

O tratamento da DC é feito apenas por dois medicamentos, o Nifurtimox (5-nitrofurano), que não é utilizado no Brasil, tendo sua comercialização proibida pela ANVISA, uma vez que possui diversos efeitos colaterais agressivos e o Benznidazol (2-nitroimidazole), que teve sua produção bastante reduzida. Ambas as drogas são derivadas do nitroheterocíclico. São prescritos e podem ser utilizados apenas com supervisão médica adequada, tanto para a fase aguda, quanto para pacientes com a forma indeterminada da doença crônica. (DIAS & DESSOY, 2009; World Health Organization, 2013).

No entanto os dois medicamentos, tem suas ações limitadas, uma vez que dependem da fase da doença, variabilidade genética da cepa, e condições fisiológicas do hospedeiro. O Índices de cura de desses medicamentos varia entre 60 % a 80% na fase aguda da doença. Quando utilizados em pacientes na fase crônica, podem retardar ou prevenir o desenvolvimento de sintomas. (GARCIA *et al.*, 2005; RASSI *et al.*,2010)

O Benznidazol atua por intermediários nitroreductores modificando o mecanismo covalente das macromoléculas dos parasitas como o DNA, e assim provoca a perda da capacidade de multiplicação Já para o mecanismo de ação do Nifurtimox supoe-se que a produção de um radical superóxido, peróx provoque a inibição da reductase tripanotona, uma enzima antioxidante de defesa específica do parasita. A falta desta enzima leva à acumulação de peróxido de hidrogénio no parasita para níveis citotóxicos, ocasionando a morte do mesmo (VAN VOORHIS,1990; COURA & DE CASTRO2002).

Tanto Nifurtimox, quanto o Benznidazol causam efeitos colaterais temporários em até 40% dos pacientes que os utilizam, tais como irritações na pele e sistema digestivo, toxicidade cerebral, anorexia e vômitos.(VIOTTI *et al.*,1994)

Assim, a busca de novas substâncias que possam ser mais eficazes contra a DC e que não provoque tanto efeitos colaterais ao paciente, continua sendo um desafio para a ciência.

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos produzidos pelas plantas como metabólitos secundários a partir dos metabolitos primários. São responsáveis pelo odor característico das plantas, interação planta-inseto, proteção contra perda de água e aumento da temperatura foliar. Suas principais características são volatilidade, insolubilidade em água e facilidade de oxidação (NASCIMENTO *et al.*, 2007; MORAIS, 2009). Os óleos essenciais são compostos por moléculas lipofílicas, com baixo peso molecular, voláteis, constituídos de hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos) e compostos oxigenados (álcoois, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas e fenóis) (NERIO *et al.*, 2010).

Existem diversas aplicabilidade para os óleos essenciais, como exemplo perfumaria, cosméticos, alimentos e medicamentos. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias e em composições farmacêuticas. Podem ser comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias

purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (SILVA-SANTOS *et al.*, 2006)

Os óleos essenciais podem estar presentes em partes diversas da planta tais como, flores, folhas, frutos, cascas e rizomas, apresentando composições e concentrações diferentes, isso ocorre por estímulos decorrentes do ambiente no qual a planta se encontra, podendo redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos, uma vez que os metabólitos secundários representam uma relação química entre as plantas e o ambiente (QUEIROZ,1993; MORAIS, 2009). Fatores como interações da planta com microrganismos, insetos e outras plantas também podem afetar a composição dos óleos essenciais, assim como, idade e estágio de desenvolvimento da planta, luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, clima, solo, época e forma de plantio, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, tempo e condições ambientais, época e horário de coleta, técnicas de colheita e pós-colheita, proveniência do material da planta (fresco ou seco), técnica de extração, variação geográfica (FONSECA, 2001; NASCIMENTO, 2007).

A extração dos óleos essenciais pode ser feita por diversas técnicas tais como maceração, expressão do pericarpo de frutos cítricos, extração por solventes orgânicos, gases supercríticos (CO₂), micro-ondas e arraste a vapor (hidrodestilação). Sendo esta ultima a técnica mais utilizada (SILVA-SANTOS *et al.*, 2006; MORAIS, 2009).

Para a identificação dos compostos químicos existentes nos óleos essenciais é necessário a utilização de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (CG-EM). Os constituintes dos óleos são então definidos comparando dados da literatura do equipamento e o Índice de Kovats de cada composto (MACHADO & FERNANDES JÚNIOR, 2011).

Ultimamente os óleos essenciais vem sendo excessivamente estudados como uma nova alternativa para desenvolvimento de medicamentos antiparasitários. Pesquisas recentes mostraram que o óleo essencial de *Cinnamomum verum* demonstrou ser extremamente eficaz nas três formas de desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas) e na diferenciação *in vitro* deste parasita (AZEVEDO *et al.*, 2014). Estudos realizados por Escobar e colaboradores (2010) com óleos essenciais de diferentes espécies de *Lippia spp*, demonstrou ter importante atividade contra *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi*.

Outro estudo realizado com a combinação de citral, eugenol e timol, principais constituintes dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Syzygium aromaticum* (cravo) e *Thymus vulgaris* (tomilho) respectivamente, sobre a proliferação dos tripanosomatídeos *Crithidia fasciculata* e *Trypanosoma cruzi* demonstraram que a combinação tripla dos compostos, foram cerca de 2 e 16,5 vezes respectivamente, mais efetivo em comparação com compostos isolados. Os dados mostraram que a combinação de componentes de óleos essenciais resultou em aumento de atividade inibidora sobre o crescimento de ambas as espécies tripanosomatídeos (AZEVEDO & SOARES, 2013).

Pesquisa realizada com dois terpenóides isolados, cariofileno e eugenol, mostraram resultados positivos quando comparados ao antiparasitário Benzonidazol, sendo capaz de inibir, em menores concentrações, o crescimento dos parasitas testados, resultando em uma alternativa contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. O cariofileno inibiu 100% dos parasitas da *Leishmania brasiliensis*, nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e eliminou 67 % dos protozoários de *Trypanosoma cruzi* na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O cariofileno também demonstrou ser mais eficaz que o eugenol no controle destes parasitas (LEITE *et al.*, 2013).

2.3 Plantas estudadas

2.3.1 *Xylopia aromatica* (Annonaceae)

A *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart possui sinonímia botânica de *Uvuaria aromática* e *Xilopia grandeflor*. É conhecida popularmente como pimenta-de-macaco ou pimenta-de-negro. É uma planta semidecídua, heliófita, característica do cerrado e campo cerrado, de distribuição ampla e descontínua, ocorre principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato grosso, Matogrosso do Sul e São Paulo, mas presente apenas em baixo nível populacional (LORENZI, 1998; SAUTU *et al.*, 2007).

Suas características morfológicas apresentam altura de 4-6 m, com tronco de 15-25 cm, revestido por casca com ritidoma subescamoso. Folhas alternas, simples lanceoladas tomentosas em ambas as faces, com nervuras primárias impressas na face adaxial de 6-14 cm de comprimento. Suas flores são brancas, bissexuais, monoclinas, sépalas conatas na base, botões piramidais (Figura 2). Frutos apocárpicos, foliculares, deiscentes e aromáticos. Sua floração pode ocorrer até duas vezes por ano, com maior

intensidade nos meses de setembro a novembro e a maturação dos frutos entre os meses de abril a julho. (DIAS, 1988; LORENZI 2014).



Figura 2: Folhas e frutos de *Xylopia aromatica*. (Arquivo pessoal)

Existem cerca de 150 espécies do gênero *Xylopia* distribuídas nas regiões tropicais do mundo. O Brasil apresenta 32 espécies de *Xylopia* descritas, distribuídas nas cinco regiões do país (MAAS *et al.*, 2010).

Os frutos da *Xylopia aromática* são usados popularmente por suas propriedades estimulantes e afrodisíacas. Alguns frutos de espécies de *Xylopia*, inclusive a *Xylopia aromatica*, também são usados como condimento, principalmente no tempero de carnes, como substituto da pimenta do reino por apresentarem semelhante odor, no entanto mais suave (MAIA *et al.*, 2005).

Estudos realizados com extratos de *Xylopia aromatica* demonstraram que essa espécie é eficaz no controle de parasitas, sendo utilizado frequentemente como antiparasitário, fungicida, antibacteriano e inseticida (STASHENKO *et al.*, 2004). Estudo realizado por Osório e colaboradores (2007) com extrato de 6 espécies da família Annonaceae, incluindo a *Xylopia aromatica*, demonstrou que esta espécie é eficiente no controle dos parasitas *Leishmania sp.* para formas promastigotas e *Trypanosoma cruzi*. O extrato de *Xylopia aromatica* também foi pesquisado frente ao *Plasmodium falciparum*, parasita causador da malária, e demonstrou-se bastante eficaz (MESQUITA *et al.*, 2007).

Estudos químicos de *Xylopia aromatica* identificaram a presença de alguns terpenos, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e esteróis, porém em outras espécies de *Xylopia* já foram identificados alcaloides do tipo isoquinolínicos

(EZEKWESELI *et al.*, 2010). Em outros trabalhos para caracterização química de frutos de diversas espécies de *Xylopi*a foram identificadas a presença de alcaloides, esteroides, flavonoides, diterpenos e saponinas. Desta forma, pode-se afirmar que plantas deste gênero representam uma fonte promissora de substâncias bioativas (ELHASSAN *et al.*, 2009).

Pesquisas que avaliaram quimicamente o óleo essencial dos frutos de *Xylopi*a *aromatica* existentes no Brasil identificaram a presença de α -pineno, β -pineno, mirceno, ocimeno, limoneno, citronelol e carvona, sendo o limoneno, citronelol, α e β -pineno os componentes majoritários. Entretanto estudo realizado com esta mesma planta originárias da Colômbia, determinou composição química diferente. Onde os componentes químicos majoritários encontrados foram o β -felandreno, mirceno, α -pineno, α -felandreno e *p*-cimeno, (STASHENKO *et al.*, 2004).

Pesquisas feitas com diversas espécies de *Xylopi*a e seus constituintes químicos, incluindo óleos essenciais, alcaloides, flavonoides e ácidos graxos insaturados demonstram atividade antioxidante, diurética, hopolipidêmica e hipoglicêmica (SILVA *et al.*, 2009; OGBONNIA *et al.*, 2010).

2.3.2 *Kielmeyera coriacea* (Clusiaceae)

A *Kielmeyera coriacea* Mart.& Zucc Calophyllaceae é conhecida popularmente como pau-santo, folha-santa, pau-de-santo ou pau-de-são-josé. É uma planta semidecídua, seletiva xerófito, característica do cerrado, com ampla distribuição e formações tanto primária como secundária e nítida preferência por terrenos drenados e elevados. Sua ocorrência vai do Piauí até São Paulo e incluindo os estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás, nos cerrados e cerradões (PINTO *et al.*, 1996; BITTRICH, 2010). É uma das principais elementos lenhosos da vegetação do Cerrado, típico do Brasil Central (RATTER *et al.*, 2003).

São árvores que apresenta de 3 à 6 m de altura, dotada de copa pequena e rala, com troco de 20 à 30 cm de diâmetro, revestido por casca muito suberosa e cor acinzentada. Folhas concentradas no ápice dos ramos, alternas e espiraladas, estreitamente ovaladas e alongadas, com 16-20 cm de comprimento e 3-6 cm de largura (Figura 3). Flores grandes actinomorfas, diclamídeas, de pétalas brancas e estames amarelos. Os frutos são cápsulas triangulares, lenhosas com sementes aladas. Floresce

durante os meses de novembro e dezembro e os frutos amadurecem nos meses de setembro e outubro (LORENZI, 2014).

Diversos estudos têm sido realizados com esta espécie principalmente investigações química e farmacêutica. Devido a sua enorme popularidade como planta medicinal, tem se buscado analisar essa planta na busca de um medicamento natural em diversas áreas da saúde (ALVES *et al.*, 2000).



Figura 3: Folhas de *Kielmeyera coriacea*. (Arquivo pessoal)

Na medicina popular, é uma planta muito utilizada como emolientes, para dores de dente e tumores. Estudo realizado por Martins (2012) verificou o efeito inibitório do óleo essencial das folhas de *Kielmeyera coriácea* em *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*, microrganismos aeróbicos bucais.

Substâncias isoladas do extrato das folhas de *Kielmeyera coriacea* mostrou atividade de proteção contra a infecção por cercaria de *Schistosoma mansoni*. Atividade antibacteriana contra *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis* (GARCIA CORTEZ *et al.*, 2002; SOBRAL *et al.*, 2009).

O extrato hexano da casca da raiz de *Kielmeyera coriacea* mostrou atividade significativa e valores de IC_{50} de $10,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ para células MDA-MB-435 (melanoma), $5,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para HCT-8(cólon), $15,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a HL-60 (leucemia), e $6,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para SF-295 (glioblastoma). Uma mistura das substâncias d-tocotrienol e a sua peroxidímero, isoladas a partir do extrato hexano das folhas de *Kielmeyera coriacea*, mostrou ser bastante ativo contra MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon), HL-60 (leucemia) e SF-295 (glioblastoma) células. A mistura reduziu a leucemia, células cancerígenas do sangue, e o crescimento das mesmas, provocando tanto a apoptose

como necrose, em concentrações de 5 e $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (BEZERRA *et al.*, 2011).

2.3.3 *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae)

A *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) é uma planta da América do Sul e possui nomes populares como de mamica-de-porca, mamiqueira, mamica-de-cadela, teta-de-cadela entre outros. Característica de mata pluvial é uma planta semidecídua, heliófita e seletiva xerófita até mesófita. Sua ocorrência é mais frequente em clareiras de matas primárias e terrenos íngremes e de rápida drenagem. Presente em todo país, principalmente em matas da encosta atlântica e na floresta semidecídua de altitude (LORENZI, 2014).

Suas características morfológicas apresentam uma planta de 6-12 m de altura, com copa densa, tronco de 30-40 cm de diâmetro revestido de casca acinzentado com acúmulos esparsos e ritidoma suberoso. As folhas compostas com 5-13 pares de folíolos com 4-8 cm de comprimento (Figura 4). A floração ocorre durante os meses de outubro e novembro e o amadurecimento dos frutos entre os meses de março a junho (SILVA & PAOLI, 2000).



Figura 4: Folhas e frutos de *Zanthoxylum rhoifolium*. (Arquivo pessoal)

Zanthoxylum rhoifolium Lam. popularmente empregada contra inflamação microbiana e malária. Atualmente, *Zanthoxylum rhoifolium* é comercializada como um componente de misturas de ervas em chás e infusões vendidos em drogarias, supermercados e mercados populares (GONZAGA *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2006). A análise química do óleo essencial das folhas *Zanthoxylum rhoifolium* mostrou que entre os seus numerosos componentes, existem alguns descritos na literatura como

substâncias citotóxicas contra células tumorais, tais como β -cariofileno (5,9%), β -elemeno (3,1%), δ -elemene (1,6%), β -humuleno (2,3%) (MOURA *et al.*, 2006; TAO *et al.*, 2006; XIAO *et al.*, 2006.).

Zanthoxylum rhoifolium é utilizado pelos habitantes que vivem ao longo do Rio Madeira (Porto Velho - Rondônia) para tratamento de câncer e malária, o alívio da dor de dentes e para reduzir os processos microbianos (FACUNDO *et al.*, 2005).

2.3.4 *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae)

Zanthoxylum riedelianum Engl. é também conhecida como tembetari, mamica-de-porca, mamica-de-cadela, tembetaíba. Sinonímia botânica de *Farara riedelianum* Engl), *Farara duckei* Albuq, *Zanthoxylum mayanum* Standl. Planta decídua, heliófita, pioneira, característica da floresta latifoliada semidecídua da bacia do Paraná. Ocorre principalmente em matas abertas e secundárias, com dispersão contínua e esparsas. Presente em São Paulo, Minas Gerais e Goiás (LORENZI, 2014).

É uma planta espinescente, com 8-18 m de altura, com tronco de 40-60 cm de diâmetro revestido de casca amarelada com ritidoma suberoso e aculeado. Folhas alternas estriladas, com 4-6 pares folíolos de 7-13 cm de comprimento por 2-5 de largura (figura 5). Flores masculinas, femininas e bissexuais amareladas dispostas em panículas multiflorais. Fruto folículo verde contendo sementes negras lustrosas. Floresce nos meses de maio e junho e os frutos amadurecem entre os meses de outubro e dezembro.



Figura 5: Galhos e folhas de *Zanthoxylum riedelianum*. (Arquivo pessoal)

No cerrado brasileiro espécies da família *Rutaceae*, como a *Zanthoxylum riedelianum*, são bastante encontradas, aumentando o interesse de pesquisadores, pois essas possuem diversas atividades biológicas (SANO *et al.*, 2008). *Zanthoxylum riedelianum* é utilizada na medicina popular contra diferentes tipos de inflamações reumáticas e manchas na pele (Da SILVA *et al.*, 2007). Os óleos essenciais de plantas deste gênero também demonstraram atividade inseticida, antimicrobiana, bactericida, fungicida, antinociceptivas, antiinflamatórias, além de serem utilizados em tratamentos cancerígenos e no combate à malária (PEREIRA, 2010).

Pesquisas anteriores com *Zanthoxylum* (Rutaceae) para investigações fitoquímica de espécies deste gênero revelaram a presença de alcaloides, flavonoides, cumarinas e terpenos (DIEH, 2000). Em *Zanthoxylum riedelianum* foi identificado a presença de terpenos no óleo essencial das folhas e cascas (LIMA, 2007).

3. OBJETIVO

Esse trabalho teve como objetivo analisar a composição química dos óleos essenciais das folhas de *Zanthoxylum riedelianum*, *Zanthoxylum rhoifolium* e *Kielmeyera coriacea* e dos frutos da *Xylopiá aromática* e *Zanthoxylum rhoifolium*, bem como avaliar a atividade tripanocida na cepa Y e atividade citotóxicos em células LLCMK₂ dos mesmos.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta do material vegetal

As folhas de *Zanthoxylum riedelianum*, *Zanthoxylum rhoifolium* e *Kielmeyera coriacea* e dos frutos da *Xylopiá aromática* e *Zanthoxylum rhoifolium* foram coletadas entre os meses de outubro de 2013 a junho de 2014, em uma área de mata ciliar na zona rural do município de Iporá, GO e identificadas pela Dra. Vânia Sardinha dos Santos. Coordenadas: *Zanthoxylum riedelianum* (latitude 16° 26' 44.29'' S, longitude 51° 8' 0.61'' O), *Zanthoxylum rhoifolium* (latitude 16° 26' 44.48'' S, longitude 51° 7' 58.72'' O), *Xylopiá aromática* (latitude 16° 21' 19.31'' S, longitude 51° 1' 0.12''), *Kielmeyera coriacea* (latitude 16° 24' 47.60'' S, longitude 51° 9' 47.58'' O). Todos os materiais vegetais coletados foram levados ainda fresco para o Laboratório de Química Orgânica do Instituto Federal Goiano campus de Iporá e em seguida realizada extração dos óleos essenciais.

4.2 Obtenção dos óleos essenciais

Para a obtenção dos óleos essenciais foi utilizado a técnica de arraste a vapor, onde 300g de cada material vegetal fresco (folhas de *Zanthoxylum riedelianum* e *Kielmeyera coriacea*; folhas e frutos de *Zanthoxylum rhoifolium* e frutos de *Xylopiá aromática*) foram triturados e juntamente com 1.500 mL de água colocados em um balão de fundo redondo com capacidade para 3.000 mL sobre uma manta aquecedora e submetido à hidrodestilação por três horas, em aparelho tipo Clevenger. O hidrolato foi extraído com o solvente diclorometano, em três repetições de 30 mL cada, e a fase orgânica foi separada com funil de separação. Em seguida, a solução foi seca com 5 g de sulfato de sódio anidro para total retirada de água e posteriormente filtrada. A

mistura foi submetida a pressão reduzida por meio de um evaporador rotativo para separação do diclorometano e o óleo essencial. O óleo essencial foi colocado em frascos de vidros bem limpos e esterizados envoltos por papel alumínio e condicionados em congelador, para assim evitar a degradação pela luz e temperatura até a análise. O rendimento percentual do óleo foi calculado relacionando a massa de óleo obtida e a massa de material vegetal fresco utilizado na extração.

4.3 Análise química do óleo essencial

As análises dos constituintes químicos dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC QP 5000, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida OPTIMA®- 5-0,25 μm (30 m x 0,25 mm) e detector por ionização por impacto eletrônico (IE) (70 e.V). Foi injetado 1 μL da solução de 10 μL de óleo essencial diluído em 1 mL de acetona. A temperatura inicial foi de 50°C mantida assim por 4,5 min, em seguida programada para aumentar a 8°C/min até 190°C, permaneceu nessa temperatura por mais 1,0 min, aumentando novamente até 250°C a 15°C/min permanecendo assim por mais 1 min. O tempo da corrida foi de 28 min. A temperatura do injetor 250°C, temperatura de interface 280°C, pressão de injeção 80 KPa, Np modo Splitless 30, faixa de varredura do espectrômetro de massas 43-450 m/z, início do start em 5 min, corte do solvente em 3,0 min e fluxo de 1,4 mL/min.

Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados pelo índice Kováts. A mistura padrão de n-Alcanos (C_9 – C_{26}), foi utilizada para verificar o desempenho do sistema CG-EM e calcular o índice de Kováts de cada composto das amostras. 1 μL destes alcanos foi injetado nas mesmas condições das amostras, descritas acima, e seus respectivos tempos de retenção foram usados como padrão externo de referência para o cálculo do índice de Kováts. Para auxiliar na identificação e caracterização dos compostos, os valores encontrados foram comparados com valores das literaturas para mesma coluna utilizada (DB-5) nas amostras. O valor do índice de Kováts é representado por expressões matemáticas dadas pela equação de Van den Dool e Kratz (equação 1) (ADAMS, 2007).

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{t_{r(\text{unknown})} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right] \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

I - índice kováts

n - número de átomos de carbono do menor n-alcanos

N - número de átomos de carbono do maior de n-alcanos

tr - tempo de retenção.

4.4 Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* dos óleos essenciais

Os ensaios sobre as formas tripomastigotas foram realizados no Laboratório de Parasitologia da Universidade de Franca (UNIFRAN), São Paulo, sobre supervisão da Prof. Dr^a Viviane Rodrigues Esperandim Sampaio.

4.4.1. Obtenção das formas tripomastigotas (parasitas)

Para a realização da atividade tripanocida *in vitro*, utilizou-se parasitas provenientes do sangue de camundongos criados no biotério da Universidade de Franca (UNIFRAN). Foi utilizada a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, constituídas por formas tripomastigotas delgadas (NUSSENZWEIG, 1953).

Os camundongos foram infectados com os parasitas 15 dias antes do ensaio. Sete dias antes do ensaio, o sangue desse camundongo é retirado por punção cardíaca e transferido para frascos de cultura contendo células (fibroblastos da linhagem LLCMK₂). As células foram cultivadas em meio RPMI, suplementado com 2×10^{-6} mol L⁻¹ de L-glutamina, 10^{-1} mol L⁻¹ de NaHCO₃, 100 U mL⁻¹ de penicilina, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal inativado, em garrafas de cultura a 37°C em ambiente a 5% de CO₂, com umidade de 95%.

No dia do experimento, o meio com as células e parasitas foram transferidos para um tubo falcon estéril; em seguida, o mesmo foi centrifugado à 8 mim, 760 rpm e 12°C. Nessa centrifugação, as células foram para o sedimento e os parasitas ficaram no sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon e submetido a uma segunda centrifugação à 30 mim a 3000 rpm (12°C). Nessa segunda centrifugação, os parasitas foram para o sedimento e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 4 mL de meio RPMI e realizado a contagem das formas parasitárias através da quantificação direta dos parasitas vivos em câmara de Neubauer.

4.4.2 Ensaio sobre as formas tripomastigotas *in vitro*

Em uma placa de microtitulação de 96 poços foram adicionados aproximadamente 1×10^6 formas tripomastigotas e posteriormente foi adicionadas o óleo essencial em análise nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 6A). Após 24 horas de incubação foi realizada a verificação da atividade biológica através da quantificação direta dos parasitas vivos em câmara de Neubauer (Figura 6B), levando-se em consideração a motilidade flagelar dos protozoários.

Os resultados obtidos foram avaliados com auxílio do software GraphPad Prism versão 5.0, visando a obtenção dos valores da concentração que inibe em 50% o crescimento do protozoário (IC_{50}) e porcentagem de lise para cada um dos óleos essenciais analisado ou seja a porcentagem de protozoário mortos por cada um dos óleos essenciais.

Como controles positivos foram utilizados o Benzonidazol e 25% de DMSO (dimetil sulfóxido) e como controle negativo 0,5% de DMSO. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

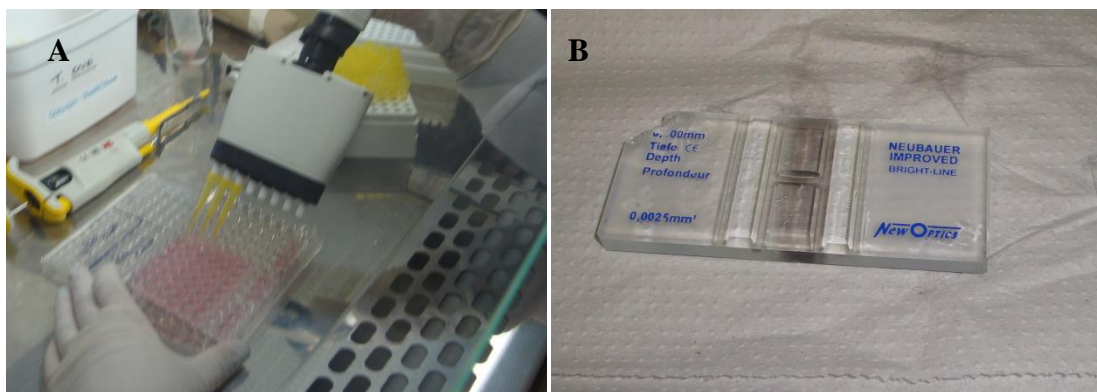


Figura 6: Placa de microtitulação de 96 poços com formas tripomastigotas e óleo essencial em análise (A); Câmara de Neubauer (B). (Arquivo pessoal)

4.5 Avaliação da atividade citotóxica dos óleos essenciais

Fibroblastos da linhagem LLCMK₂ (linhagem secundária de células de rim de macaco) foram cultivados em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (100 mL) e 5 mL de antibiótico, em garrafas de cultura a 37 °C em ambiente a 5% de CO₂, com umidade de 95%. No dia do experimento, retirou-se o meio com as células da garrafa de cultura transferindo-os para um tubo falcon estéril. Em seguida, o mesmo foi centrifugado à 1500 rpm e 4°C por 15 minutos. Após a centrifugação,

retirou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1 mL de RPMI completo para acertar o número de células para 1×10^6 .

Em uma placa de microtitulação de 96 poços foram adicionados aproximadamente 1×10^6 formas de células e posteriormente foi adicionado o óleo essencial em análise nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 e 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 7A). Como controle positivo e controle negativo foram utilizados 25% e 0,5% de DMSO, respectivamente. Após esse procedimento, a placa foi incubada em estufa de CO_2 por 24 horas. Após este período foi acrescentado 5mg mL^{-1} de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) em cada poço e a placa foi encubada por mais 4 horas. MTT é um sal de tetrazolium que absorvido pela célula, é reduzido no interior da mitocôndria por enzimas desidrogenases, formando cristais de formazana. A forma oxidada é amarela e a forma reduzida é de cor púrpura. Quanto mais púrpura, maior a re atividade da célula com MTT, e assim maior o número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

No término desse período, procedeu-se a leitura da placa em leitor de ELISA, através da técnica colorimétrica pelo MTT (Figura 7B). As absorbâncias foram analisadas no programa GraphPad Prism versão 5.0 para determinação do IC_{50} dos óleos analisados e o cálculo da porcentagem de células viáveis. Cada ensaio foi realizado em triplicata, em três experiências independentes. A concentração citotóxica 50% (CC_{50}) foi determinada por análise de regressão. O índice de seletividade (SI) foi determinada pela razão de CC_{50} para IC_{50} .

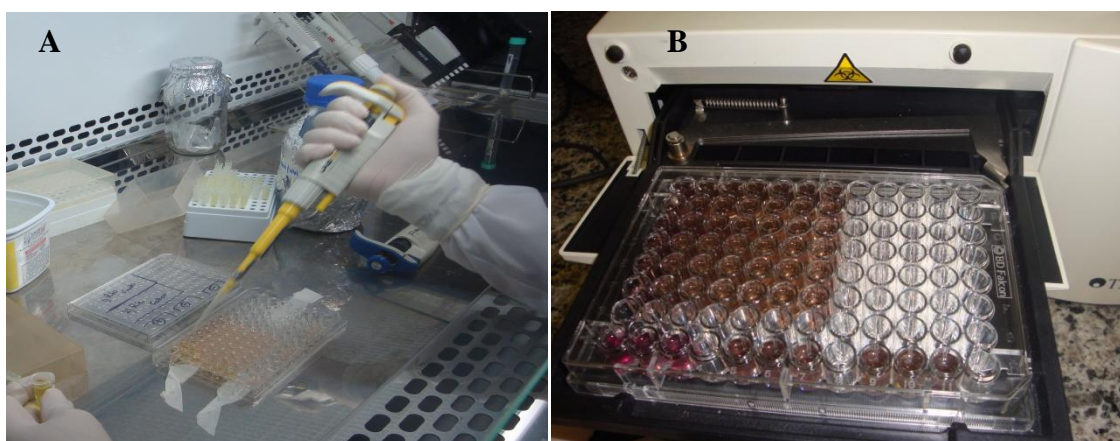


Figura 7: Placa de microtitulação de 96 poços com óleo essencial em análise adicionado a fibroblastos da linhagem LLCMK₂ (A); Placa de microtitulação de 96 no leitor de ELISA em técnica colorimétrica pelo MTT (B). (Arquivo pessoal)

4.6 Normas Éticas

Todos os experimentos da metodologia que envolveram o uso de animais de laboratório foram realizados de acordo com os padrões éticos da Fundação Oswaldo Cruz e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de Franca 010/145.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teor e aspecto físico dos óleos essenciais extraídos

A extração do material vegetal, folhas de *Zanthoxylum riedelianum*, *Zanthoxylum rhoifolium* e *Kielmeyera coriacea* e dos frutos da *Xilopia aromatica* e *Zanthoxylum rhoifolium* resultou em 5 óleos essenciais com teor e aspecto físicos diferentes. O cálculo do teor de cada óleo foi expresso em porcentagem em relação a massa vegetal utilizada. A tabela 1 resume estas características.

Tabela 1: Cor e teor dos óleos essenciais extraídos

Material vegetal	Cor	Teor (%)
<i>kielmeyera coriacea</i> (folha)	Amarela escuro	0,038
<i>Zanthoxylum riedelianum</i> (folha)	Amarela claro	0,030
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> (folha)	Amarela claro	0,020
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> (fruto)	Translúcido	0,440
<i>Xilopia aromatica</i> (fruto)	Translúcido	0,800

Os óleos essenciais são metabólitos secundários, e como tal estão sujeitos a constantes variações de concentração na planta. Isso pode ser devido a diversos fatores, tais como sazonalidade e ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes (macro e micronutrientes), altitude e até mesmo poluição atmosférica, entre outros (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Em estudo realizado por Christofoli (2014) mostra que o teor dos óleos das folhas da *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum riedelianum* variaram muito durante os meses ano, de 0,01% (fevereiro) a 0,06% (novembro) e 0,03% (fevereiro) a 0,03% (novembro) respectivamente. Já em estudo realizado por Oliveira (2102) com *Xylopi*

aromática, demonstrou que teor de óleo essencial extraído dos frutos secos dessa espécie foi (2,2%).

5.2. Análises químicas dos óleos essenciais

5.2.1 Análises químicas dos óleos essenciais dos frutos *Xylopia aromatica* (Lam.)

Mart. (Annonaceae)

A *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (Annonaceae), é a espécie menos estudada entre as do gênero *Xylopia*. A caracterização química do óleo essencial dos frutos *Xylopia aromatica* é limitada a poucas literaturas, sendo Silva e Rocha (1981) os primeiros a trabalharem com a caracterização desse óleo e avaliarem a presença de terpenos, tais como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e esteróis.

As Figuras 9 e 10 mostram os cromatogramas do óleo essencial dos frutos de *Xylopia aromatica* obtidos nas melhores condições estabelecidas para análise. Foram identificados pelo CG-MS sete picos, sendo que cada pico representa um composto químico diferente. O composto majoritário corresponde ao pico sete no tempo de retenção de 9,34 mim, foi identificado como sabineno (69,72%) (Figura 8). Foram identificados com valores expressivo o 1R- α -pineno (6,85) e α -thujeno (5,12%) (Tabela 2).

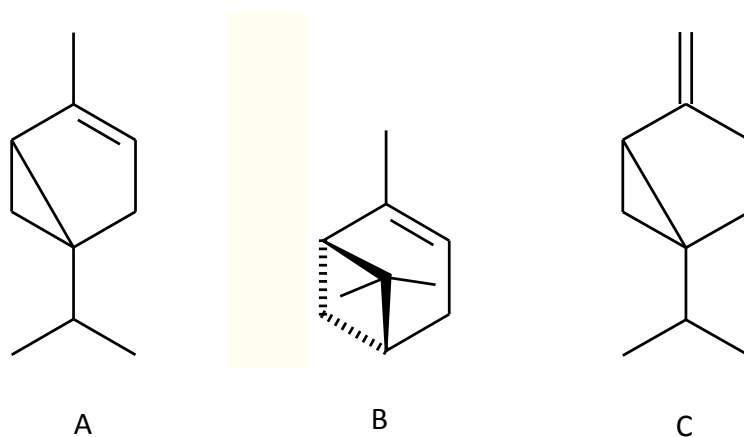


Figura 8: Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial dos frutos *Xylopia aromatica*: A- α -thujeno; B- α -pineno; C- sabineno (ADAMS, 2007).

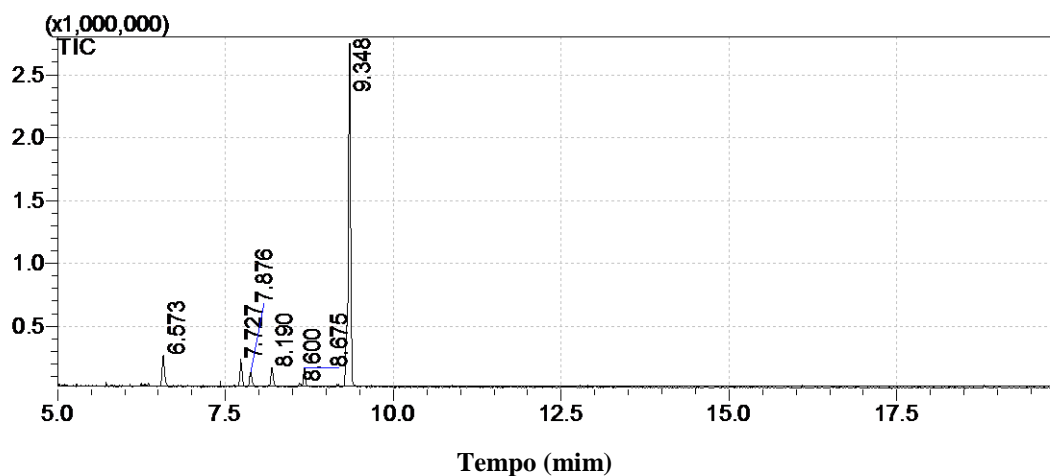


Figura 9- Cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial dos frutos de *Xylopiya aromatica*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min.

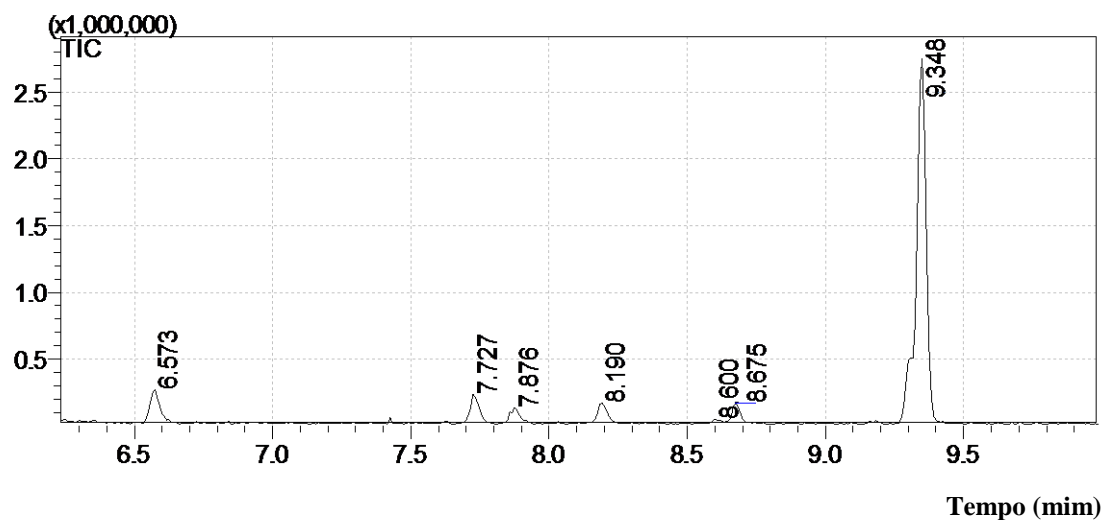


Figura 10- Ampliação do Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial dos frutos de *Xylopiya aromatica*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min.

Em estudos realizados por Andrade e colaboradores (2004), avaliaram quimicamente o óleo essencial dos frutos de *Xylopiya aromatica* e conseguiram

identificar os compostos α -pineno e β -pineno, como os componentes majoritários. Estes resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho.

Tabela 2: Constituintes químicos do óleo essencial dos frutos *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (Annonaceae).

Picos	Constituintes	T R(mim) CG-EM	*IK Cal.	**IK Lit.	Área (%) CG-EM
1	1R- α -pineno	6,573	NE	NE	6.85
2	α -thujeno	7,727	930	931	5.12
3	α -pineno	7,876	935	933	3,39
4	β -mirceno	8,190	947	991	3.69
5	cis- β -ocimeno	8,601	962	1040	0.22
6	α -felandreno	8,675	964	1005	2.91
7	Sabineno	9,348	989	976	69.72
Total Área (%) Identificada					91.90

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007), baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

NE = Não Encontrado

Em estudos realizados por Oliveira e colaboradores (2012) identificaram a composição química do fruto de *Xylopia aromatica* por análise em CCD e CG- EM. Identificaram a presença de mirceno, citronelol e cariofileno através da comparação com o fator de retenção (Rf) das amostras de referência. A análise química por CG-EM confirmou a presença de mirceno e cariofileno, e evidenciou a presença do monoterpene 4,5-dimetil-1-hexeno, e um pico que poderia corresponder ao β -pineno. Estes constituintes que não foram identificados no presente trabalho.

Os óleos essenciais de folhas de *Xylopia frutescens* e *Xylopia laevigata* demonstraram que sesquiterpenos são os constituintes dominantes. Os constituintes principais de *Xylopia frutescens* foram cariofileno (24,8%), biciclogermacreno (20,8%), germacreno (17,0%), β -elemeno (7,9%) e β -ocimeno (6,8%). Para a *Xylopia laevigata* obteve quantidade significativa de D-germacreno (18,9%), biciclogermacreno (18,4%),

β -elemeno (9,5%), δ -selineno (9,2%), cariofileno (8,5%), germacreno (5,7%) e γ -muuroleno (5,7%) (BRASIL, *et al.*, 2013). Apesar de serem espécies da mesma família da *Xylopia aromatica* os constituintes identificados não foram encontrados no óleo essencial dos frutos da *Xylopia aromatica* do presente trabalho.

Alguns dos constituintes químicos encontrados no óleo essencial dos frutos da *Xylopia aromatica* podem ser observado em outros trabalhos da mesma espécie, como o α -pineno e limoneno já o α -felandreno, cis- β -ocinemo e sabineno não foram identificados em análises anteriores desta mesma espécie (ANDRADE, *et al.*, 2004). Uma explicação pra tal diferença está na própria planta, pois a composição dos óleos essenciais é determinada geneticamente e pode variar por diversos fatores, tais como origem botânica, ciclo vegetativo, clima, tipo de solo e muitos outros (CHEN *et al.*, 2011).

5.2.2 Análises químicas dos óleos essenciais dos frutos *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae)

Nas Figuras 11 e 12 são apresentados os cromatogramas do óleo essencial dos frutos de *Zanthoxylum rhoifolium*. Podem ser observados dez picos, sendo que cada um corresponde a um composto químico diferente.

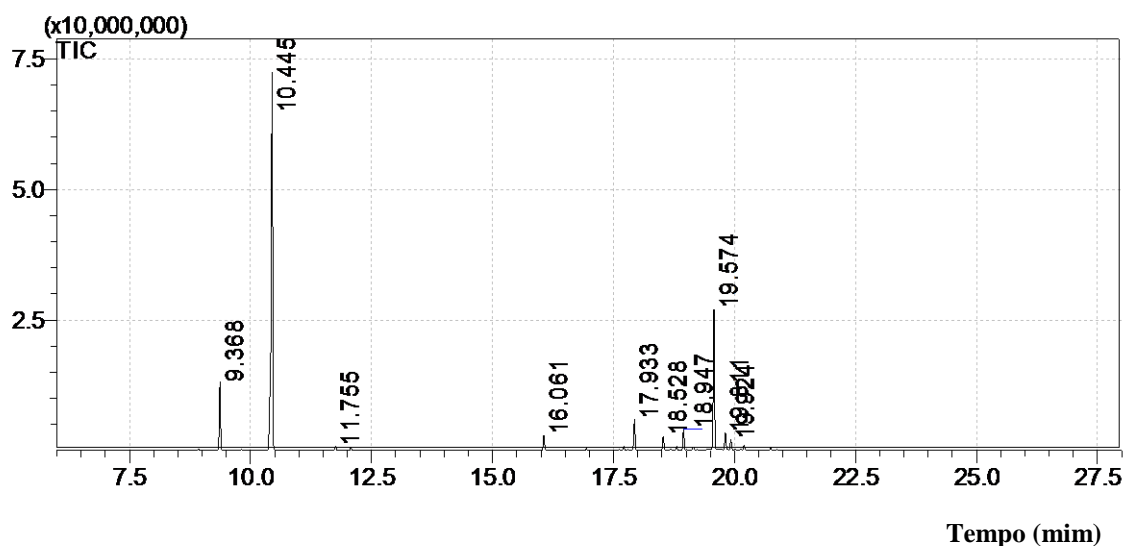


Figura 11- Cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial dos frutos de *Zanthoxylum rhoifolium*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min.

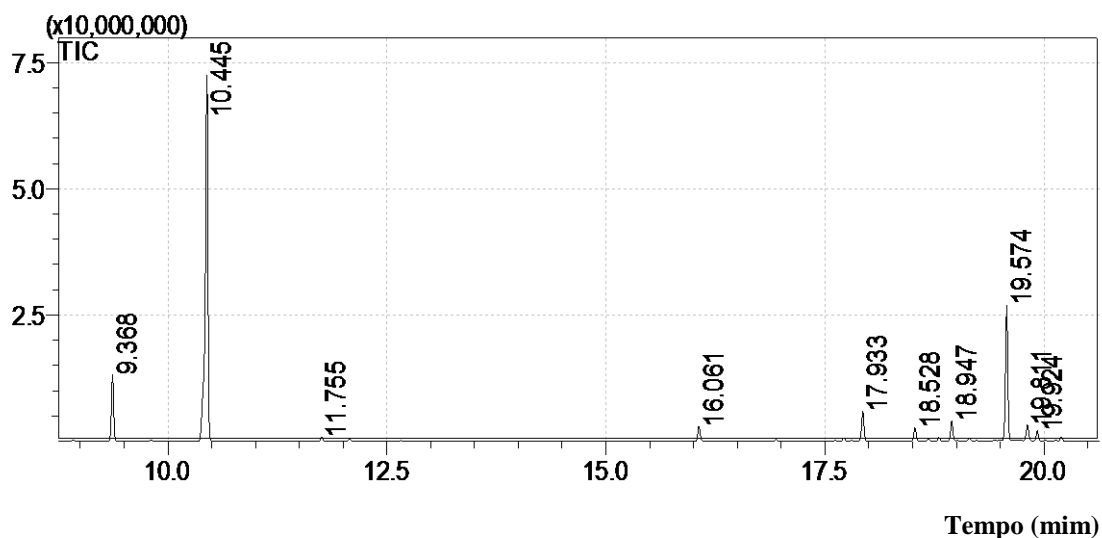


Figura 12- Ampliação do cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial dos frutos de *Zanthoxylum rhoifolium*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min.

Foram identificados dez compostos químicos (Tabela 3), dentre os quais o sabineno (55,94%) como composto majoritário, seguido do D-germacreno (17,12%) e β -mirceno (8,03%) (Figura 13)

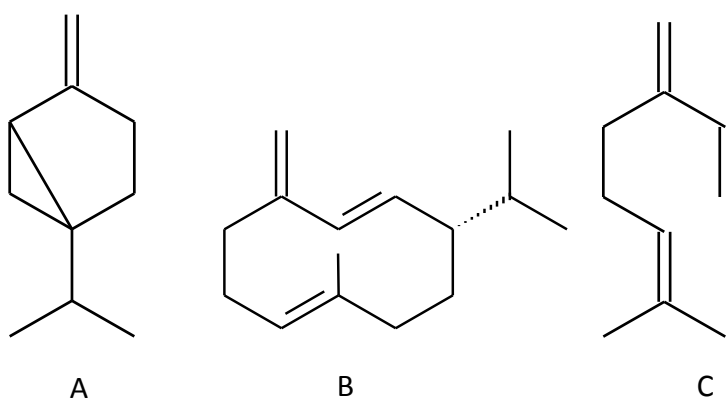


Figura 13: Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial dos frutos de *Zanthoxylum rhoifolium*: A- sabineno; B- D-germacreno; C- mirceno (ADAMS, 2007).

A análise química do óleo essencial dos frutos dessa espécie por Costa e colaboradores permitiu a identificação de nove constituintes, sendo o trans- β -ocimeno

(33,90%), linalol (23,27%) e undecanona (16,19%) com maiores porcentagem. O estudo também demonstrou que o óleo essencial possui eficaz atividade antibacteriana, demonstrando resultados significativos resultados contra *larvicida acti* (COSTA *et al.*, 2008).

Já em trabalho realizado por Christofoli (2014), analisando os constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium*, identificou como compostos majoritários β -elemeno (31,26%), D-germacreno (18,16%) e β -cariofileno (12,09%).

Estudo realizado por Pietro e colaboradores (2011) determinou a composição química dos óleos essenciais dos frutos de *Zanthoxylum monophyllum*, *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum Fagara*. Os principais constituintes químicos do óleo essencial de *Zanthoxylum rhoifolium* foram, o β -mirceno (59,03%), β -felandreno (21,47%) e D-germacreno (9,28%), estes compostos aparecem também no óleo essencial dos frutos de *Zanthoxylum rhoifolium* do presente trabalho. Para os óleo essencial de *Zanthoxylum monophyllum* o binene (25,71%), 1,8-cineol (9,19%) e cis-4-thujanol (9,19%), foram os principais constituintes químicos encontrados e para o óleo essencial da *Zanthoxylum Fagara* o D-germacreno-4-ol (21,1%), elemol (8,35%), e o cadinol (8,22%) foram os mais abundantes. Este estudo também avaliou o efeito destes óleos essenciais nos fungos patogênicos *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum*, mostrando que estes exibem excelente atividade fungicida (PIETRO *et al.*, 2011).

O fruto da *Zanthoxylum schinifolium*, teve a composição química do óleo essencial analisado, sendo identificados como componentes majoritários o linalol (28,2%), limoneno (13,2%) e sabineno (12,1%), este ultimo também encontrado no presente trabalho. A atividade antibacteriana, como, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do óleo essencial do fruto dessa espécie também foram avaliadas contra bactérias selecionadas, incluindo agentes patógenos de origem alimentar, demonstrando real eficácia para tais (DIAO *et al.*, 2013).

Tabela : Constituintes químicos do óleo essencial dos frutos de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae)

Picos	Constituintes	T R(mim) CG-EM	*IK Cal.	**IK Lit.	Área(%) GC-EM
1	β -mirceno	9.368	989	991	8,03
2	Sabineno	10.445	1031	976	55,94
3	2-undecanano	16.061	1336,28	NE	1,95
4	β -elemeno	17.933	1393,62	1375	3,96
5	β -cariofileno	18.528	1428,2	1408	1,73
6	Ciclohexeno	18.801	1447,41	NE	0,45
7	7,11-dimetil-3- metileno 1,6,10- Dodecatrieno	18.947	1456,87	NE	2,56
8	D-Germacreno	19.574	1489,48	1480	17,12
9	δ – elemeno	19.811	1504,05	1430	2,33
10	β -bisaboleno	19.924	1523,96	1509	1,25
Total Área (%) Identificada					95.32

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007), baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

NE = Não Encontrados.

5.2.3 Análises químicas dos óleos essenciais das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae)

As Figuras 14 e 15 mostram os cromatogramas do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* obtidos nas melhores condições estabelecidas para análise.

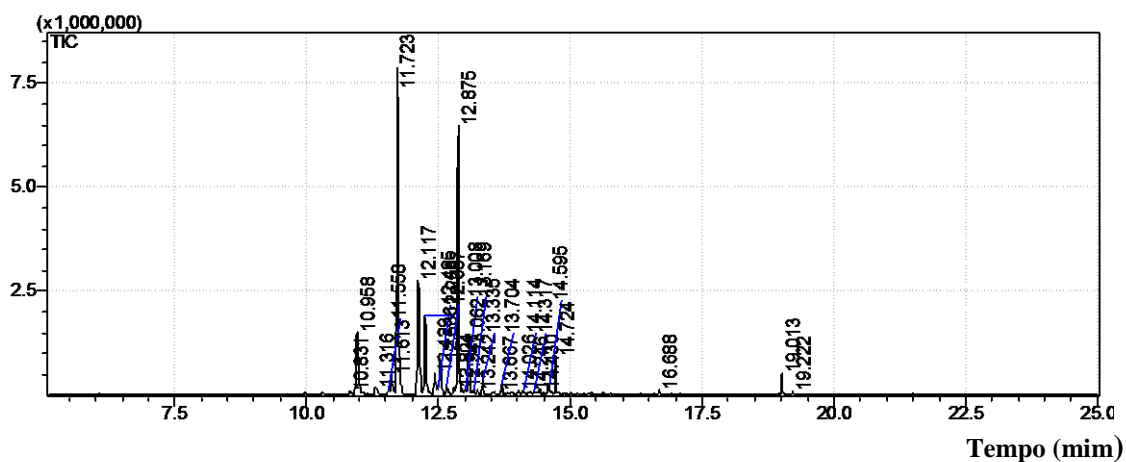


Figura 14- Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min.

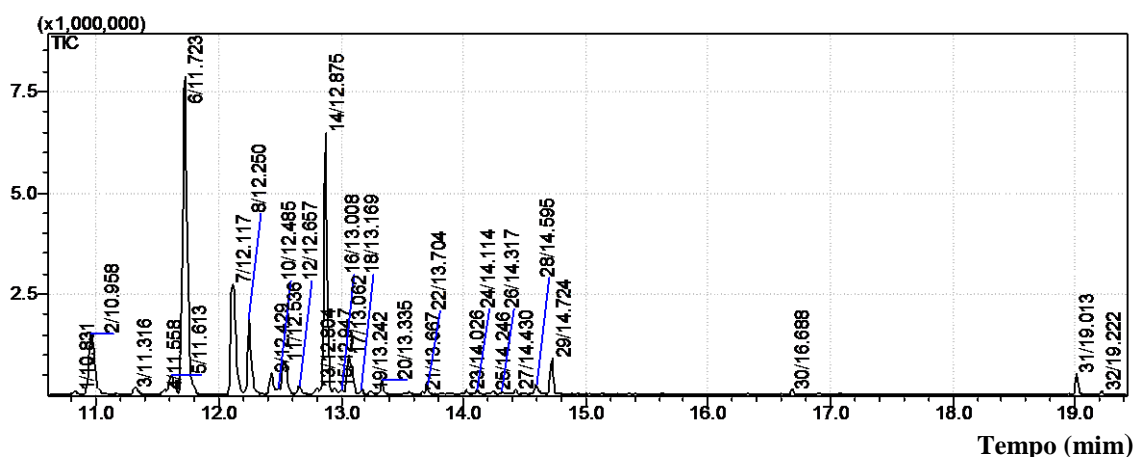


Figura 15- Ampliação do Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min.

Nos cromatogramas foram identificados trinta e dois picos, correspondendo cada pico um composto químico presente no óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium*. Dos compostos encontrados, os que apresentaram maiores porcentagens foram β -elemeno (31,26%), D-germacreno (18,16%), β -cariofileno (12,09%), δ -

elemeno (7,63%), β -cedreno (6,69%), biciclogermacreno (4,57%) (Figura 16), como se pode ver na Tabela 4.

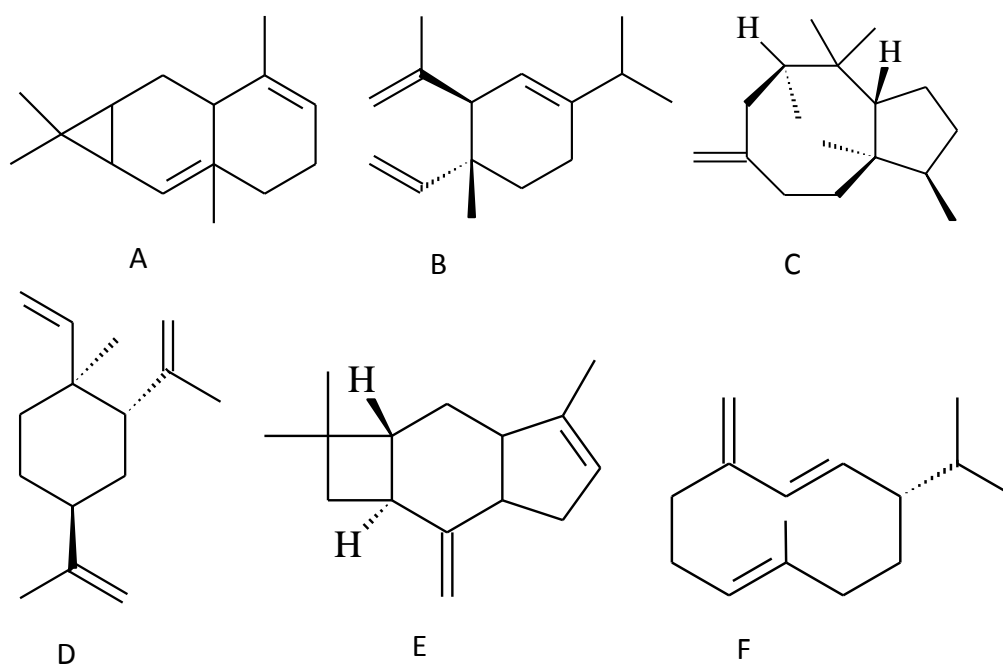


Figura16: Estrutura química dos compostos majoritário óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium*: A- Biciclogermacreno ; B- δ -elemeno; C- β -cedreno; D- β -elemeno; E- β -cariofileno; F- D-germacreno (ADAMS, 2007).

Tabela 4: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae).

Picos	Constituintes	TR(mim) CG-EM	*IK Cal.	**IK Lit.	Área(%) CG-EM
1	4,7,7-trimetilbiciclo[4.1.0] heptan-3-ol	10,831	1329,283	NE	0,32
2	δ-elemeno	10,958	1337,952	1335	7,63
3	Geranil Acetato	11,316	1362,389	1379	0,75
4	A-cubebeno	11,558	1378,908	1387	0,44
5	2,4-diisopropenil-1-metil- 1-vinilciclohexano	11,613	1382,662		2,08
6	β-elemeno	11,723	1390,171	1389	31,26
7	β-cariofileno	12,117	1419,639	1408	12,09
8	β-cedreno	12,250	1430,086	1419	6,69
9	Seicheleno	12,429	1444,148	1446	1,91
10	β-farneseno	12,485	1448,547	1454	0,42
11	E-cariofileno	12,536	1452,553	1464	3,63
12	Tau cadinol	12,657	1462,058	1475	0,82
13	1,1,7-trimetil-4- metilenedecahidro-1H- ciclopropa[e]azuleno	12,804	1473,606	NE	0,56
14	D-germacreno	12,875	1479,183	1484	18,16
15	biciclo[5.3.0]decano, 2- metilene-5-(1-metilvinil)- 8-metil	12,947	1484,839	NE	0,49
16	Cedreno	13,008	1489,631	NE	0,36
17	Biciclogermacreno	13,062	1493,873	1500	4,57
18	α-farnesenoE	13,169	1502,524	1505	0,32
19	D-cadinol	13,242	1508,877	NE	0,25
20	biciclo[4.1.0]-3-hepteno, 2-isopropenil-5-isopropil- 7,7-dimetil	13,335	1516,971	NE	0,95
21	3-hexen-1-ol benzoato	13,667	1545,866	NE	0,16
22	nerolidol E	13,704	1549,086	1561	0,55
23	Viridiflorol	14,026	1577,111	1592	0,12
24	1,2-15,16- diepoxihexadecano	14,114	1584,769	1600	0,25
25	2-isopropenil-5-metil-6- hepten-1-ol	14,246	1596,258	NE	0,13
26	2-nitro-2-hepten-1-ol	14,317	1602,649	NE	0,13
27	cis-Z-α-bisabolenoepoxide	14,430	1613,340	NE	0,52
28	Tau-muurolol	14,595	1628,950	1644	0,68
29	α-cadinol	14,724	1641,154	1652	2,09
30	Hexadecanal	16,688	1837,045	NE	0,24
31	Fitol	19,013	1999,656	1942	1,26
32	2,4-dimetil-1-heptanol	19,222	2024,911	NE	0,17
Total Área (%) Identificada					100

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007), baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

NE = Não Encontrados

Em trabalho realizado por Boehme e colaboradores (2008) para investigação dos principais constituintes do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* determinou que D-germacreno (14,6%), limoneno (12,5%), trans-2-hexenal (11,3%), elemeno (9,2%), 2-undecanona (9,2%), mirceno (7,9%), biciclogermacreno (7,5%) e germacreno (5,2%) foram os principais compostos encontrados. No presente trabalho também foram identificados o D-germacreno e o biciclogermacreno.

5.2.4 Análises químicas dos óleos essenciais das folhas *Zanthoxylum riedelianum* Lam. (Rutaceae)

As Figuras 17 e 18 mostram os cromatogramas do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum riedelianum* obtidos nas melhores condições estabelecidas para análise.

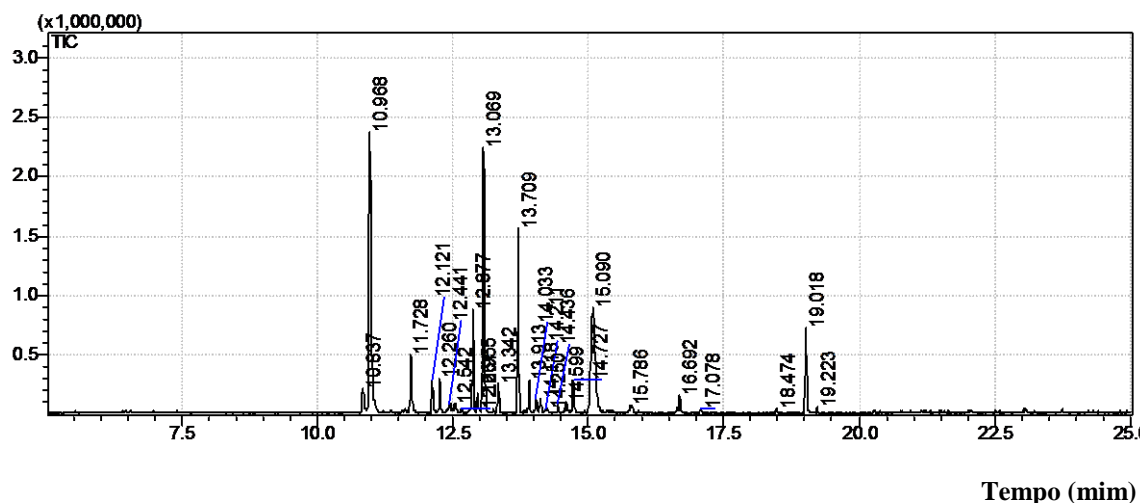


Figura 17- Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum riedelianum*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min.

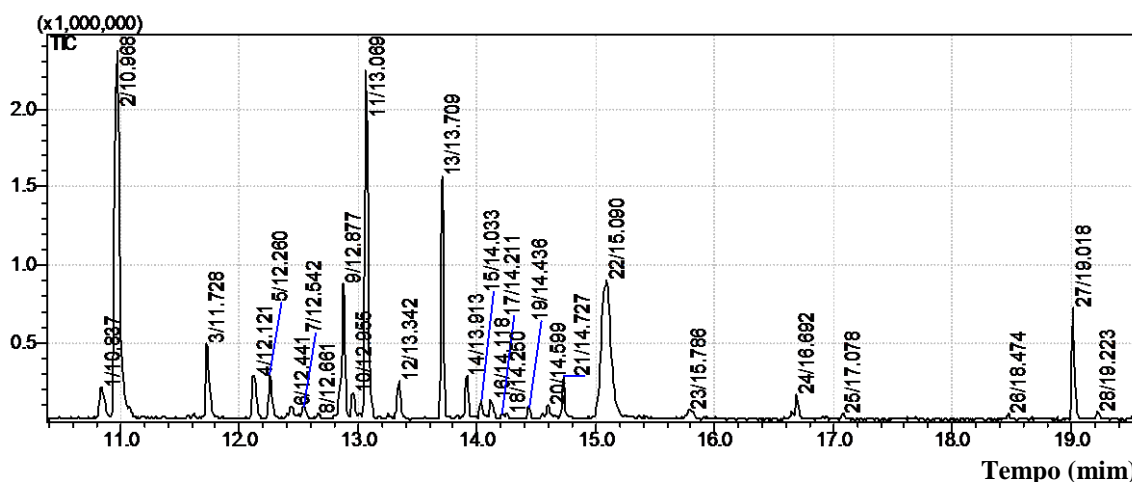


Figura 18- Ampliação do Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum riedelianum*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 50 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min.

Na tabela 5 podemos observar todos os 28 constituintes encontrados no óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum riedelianum*. Os constituintes que apresentam maior porcentagem são γ -elemeno (24,81%) fitol (18,16%) e α -bisaboleno-epoxide (16,18%) (Figura 19).

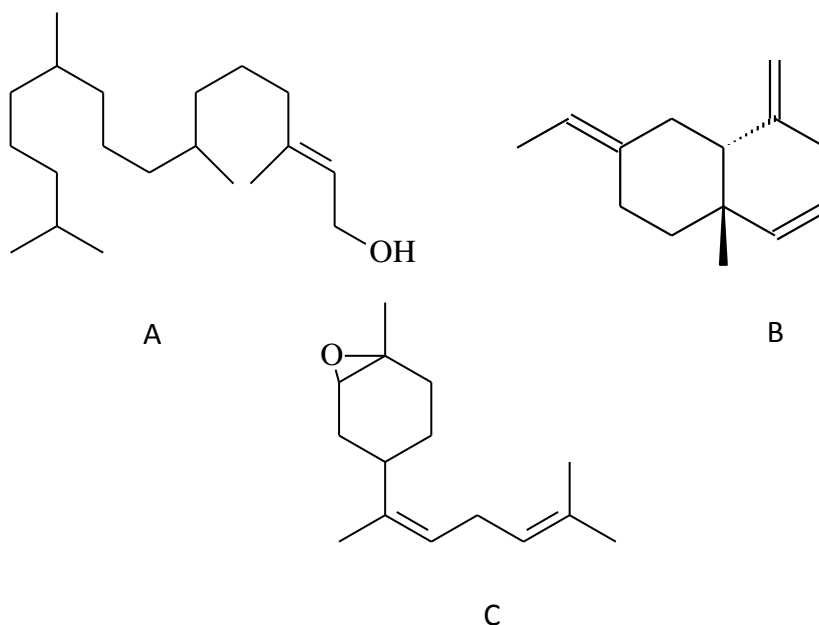


Figura 19: Estrutura química dos compostos majoritário do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum riedelianum*: A- fitol; B- γ -elemeno; C- α -bisaboleno-epoxide (ADAMS, 2007).

Tabela 5: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum riedelianum* Lam. (Rutaceae).

Picos	Constituintes	T R(mim) CG-EM	*IK Cal.	**IK Lit.	Área(%) CG-EM
1	2,5,6-trimetil-1,3,6-heptatrieno	10,837	1329,693	NE	1,90
2	γ -elemeno	10,968	1338,635	1432	24,81
3	2,4-diisopropenil-1-metil-1-vinilciclohexano	11,728	1390,512	NE	3,68
4	Aromadrendeno	12,121	1419,953	1439	2,49
5	γ -muuroloeno	12,260	1430,872	1478	2,12
6	1,11-hexadecadiino	12,441	1445,090	NE	0,35
7	Isotujol	12,542	1453,024	NE	0,58
8	1-cloroundecano	12,661	1462,372	NE	0,39
9	D-germacreno	12,877	1479,340	1484	6,52
10	Biciclo(5.3.0)decano-2-metileno-5-(1-metilvinil)-8-metil	12,955	1485,467	NE	1,08
11	Biciclogermacreno	13,069	1494,423	1500	16,18
12	δ -cadineno	13,342	1517,581	1522	1,40
13	<i>cis</i> -nerolidol	13,709	1549,521	1531	8,26
14	Espatuleno	13,913	1567,276	1577	1,58
15	Cariofileno Oxide	14,033	1577,720	NE	0,55
16	Viridiflorol	14,118	1585,117	1592	0,65
17	Eudesmol	14,211	1593,211	1619	0,20
18	Isopulegol	14,250	1596,606	NE	0,15
19	α -bisaboleno epoxide	14,436	1613,907	NE	0,41
20	α -muurolol	14,599	1629,328	1644	0,51
21	α -cadinol	14,727	1641,438	1652	1,64
22	Fitol	15,090	1675,781	1942	18,16
23	1-hexanol,2-(hidroximetil)	15,786	1744,177	NE	0,78
24	δ -cadineno	16,692	1837,473	NE	0,71
25	Palmitaldeído	17,078	1878,801	NE	0,28
26	α -ácido Linolênico	18,475	1968,789	NE	0,25
27	NI	19,018	1999,943	NE	4,10
28	5,6-dimetildecano	19,223	2025,034	NE	0,27
Total Área (%) Identificada					100

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007), baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

NE = Não Encontrados

NI= Não indentificado

Em trabalho realizado por Christofoli (2014), analisando a composição química do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum riedelianum* demonstrou que os principais constituintes químicos foram fitol, Bicyclogermacreno, *cis*-nerolidol, D-germacreno, constituintes que também foram identificados no presente trabalho.

Pesquisa com a espécie *Zanthoxylum caribaeum* identificaram 54 componentes no óleo essencial das folhas, sendo 90,4% da composição relativa à sesquiterpenos (47,3%) e monoterpenos (41,2%). Além disso, os principais constituintes, muurola-4,5-trans-dieno e isodauceno, foram descritos pela primeira vez no óleo essencial das folhas desta espécie, sendo considerado um excelente inseticida (NOGUEIRA *et al* 2014).

O óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum molle* foi analisado por Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas detectando 51 compostos, sendo que o 2-undecanona (26,81%), limoneno (20,12%) e terpinen-4-ol (13,09%) foram os principais componentes (TIANA *et al* 2013). O óleo das folhas de *Zanthoxylum setulosum* também foi investigado mostrando que os principais composto químicos encontrados foram felandreno (37,5%), cariofileno (13,7%), pineno (11,9%), germacreno (10,9%), mirceno (5,9%) e nerolidol (5,4%) (BOEHME ET al., 2008). Apesar dessa espécies pertencerem a mesma família da *Zanthoxylum riedelianum*, nenhum desses compostos foram encontrados no presente trabalho.

5.2.2 Análises químicas dos óleos essenciais das folhas *Kielmeyera coriacea*

As Figuras 21 e 22 mostram os cromatogramas do óleo essencial das folhas de *Kielmeyera coriacea* obtidos nas melhores condições estabelecidas para análise. A Tabela 6 apresenta os 21 constituintes químicos identificados no óleo essencial das folhas de *Kielmeyera coriacea*. Os constituintes que apresentaram maior porcentagem foram n-tetradecano (13,46%), D-germacreno (12,08%), δ -amorfenol (11,72%) e cariofileno 10,04%) (Figura 20).

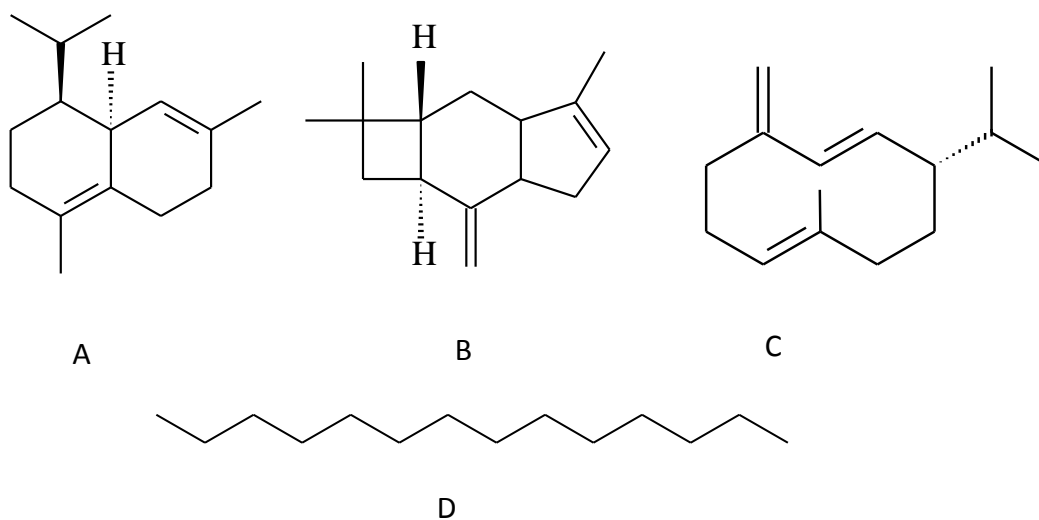


Figura 20: Estrutura química dos compostos majoritário do óleo essencial das folhas de *Kielmeyera coriacea*: A- δ -amorfenno; B- cariofileno; C- D-germacreno; D- n-tetradecano (ADAMS, 2007).

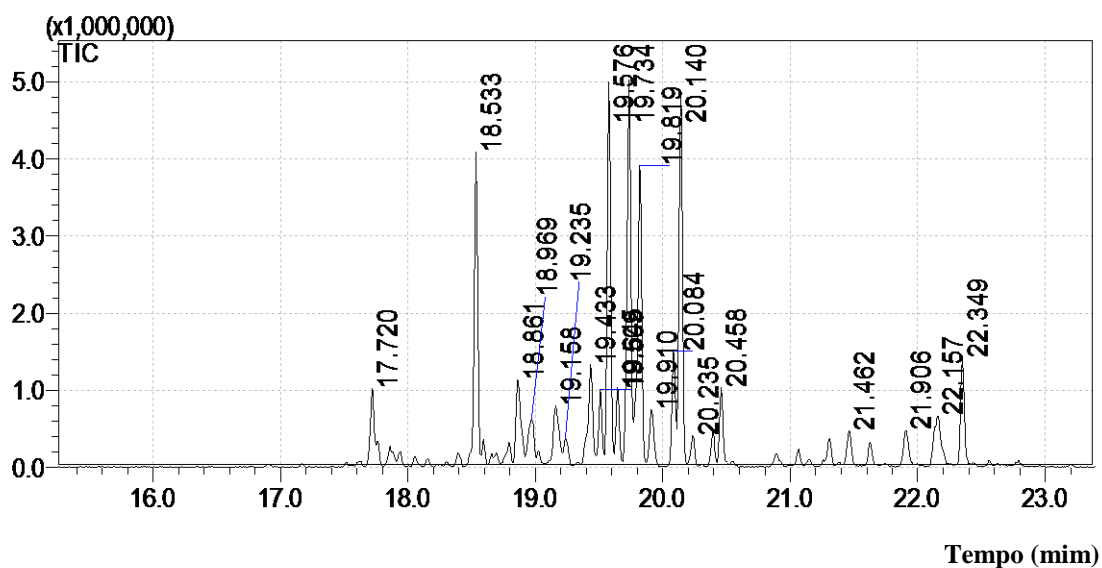


Figura 21- Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial das folhas de *Kielmeyera coriacea*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min.

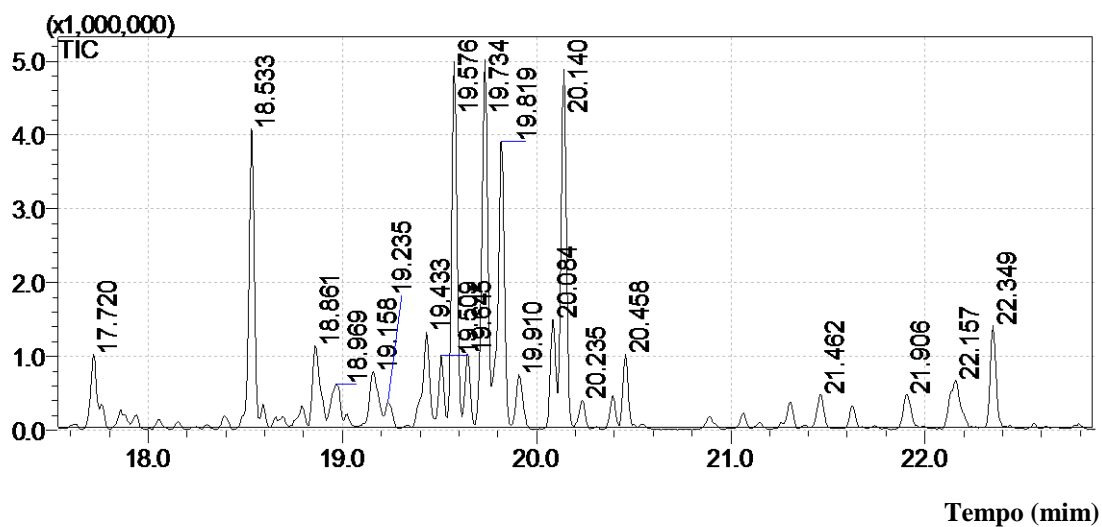


Figura 22- Ampliação do Cromatograma obtido no CG-EM para o óleo essencial das folhas de *Kielmeyera coriacea*. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 50° C; tempo inicial de 4,5 min, a temperatura da coluna aumentou de 8°C/min até 190° C, permanecendo nesta temperatura por 1,0 min, aumentando novamente até 250 °C a 15 °C/min e mantida por 1,0 min.

Tabela 6: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc.

Picos	Constituintes	TR(mim) CGE-ME	*IK Cal.	**IK Lit.	Área(%) CG-EM
1	Isolendeno	17,720	1282,00	NE	2,75
2	Cariofileno	18,533	1328,85	NE	10,04
3	1Hciclopropen(e)azuleno,decahidro-1,1,7-trimetil	18,861	1348,12	NE	3,75
4	Azuleno	18,969	1354,47	NE	2,38
5	Cis- α -bisaboleno	19,158	1366,00	NE	3,49
6	1H-ciclopentanol	19,235	1370,00	NE	1,09
7	Nafitaleno,1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-dimetil	19,434	1382,00	NE	4,30
8	β -bourboneno	19,509	1386,19	1387	2,29
9	D-germacreno	19,576	1390,13	1389	12,08
10	Nafitaleno,1,2,4a,5,8,8a-hexahidro-4,7-dimetil	19,645	1394,18	NE	2,44
11	n-tetradecano	19,734	1399,41	1400	13,46
12	(+)-cicloisositiveno	19,819	1404,68	NE	11,55
13	NI	19,910	1410,36	NE	2,26
14	β -cedreno	20,085	1421,27	1417	3,76
15	δ -amorfenol	20,140	1424,70	1512	11,72
16	Tau-cadinol	20,235	1430,63	1430	1,08
17	α -muuroleno	20,458	1444,54	NE	2,24
18	5-azulenementanol	21,462	1507,22	NE	1,20
19	Cubenol	21,906	1535,09	1537	1,39
20	1-nafitalenol	22,158	1550,91	NE	3,19
21	Tau-muurolol	22,350	1562,96	NE	3,54
Total Área (%) Identificada					99,98

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007), baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

NE = Não Encontrados

NI= Não identificado

Poucos estudos foram realizados para determinar a composição química do óleo essencial das folhas de *Kiameyera coriacea*. Um dos primeiros trabalhos realizado para investigação química dos óleos essenciais de várias partes dessa espécie foi o de Martins (2012). Neste trabalho, este autor identificou como principais constituintes o D-germacreno (24,21%), trans-cariofilano (15,46%) e biciclogermacre (11,63%) . Também foram identificados os α -copoeno, o β -bourboneno, o β -elemeno e o β -cedreno em menores quantidades. No presente trabalho apenas o cariofileno foi encontrado.

Já estudo realizado com a *Kiameyera rugosa* foi possível identificar no óleo essencial das folhas 41 compostos, sendo sua grande maioria sesquiterpenos, sendo os principais α -cubebeno (13%), o α -copoeno (11%), o β -cubebeno (5-9%) e o β -cariofileno (9-13%) (ANDRADDE, 2007). Apesar dessa espécie pertencerem a mesma família da *Kiameyera coriacea*, nenhum desses compostos foram encontrados no presente trabalho.

5.3 Avaliação da atividade tripanocida dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, constituídos principalmente de terpenos e sesquiterpenos, sendo estes capazes de possuir atividades antimicrobiana, fungicida, antiviral, entre outras (NERIO *et al.*, 2010). Neste trabalho, todos os óleos essenciais testados mostraram eficácia, causando lise celular das formas tripomastigota em todas as concentrações testadas.

Os óleos essenciais que apresentaram melhores atividades foram os das folhas *Kiameyera coriacea* (IC_{50} 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e frutos *Xylopiá aromática* (IC_{50} 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), , seguidos pelo óleo essencial dos frutos *Zanthoxylum rhoifolium* (IC_{50} 8,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) como observado na tabela 7.

Os óleos essenciais das folhas *Zanthoxylum riedelianum* e folhas *Zanthoxylum rhoifolium* apresentaram IC_{50} 13,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 29,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, demonstrando assim atividade interessante mesmo possuindo valores de concentrações inibitórias mais elevadas quando comparados com o controle positivo Benzonidazol IC_{50} 9,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 7: Porcentagem de lise das tripomastigotas e concentração de inibição (IC₅₀) dos óleos essenciais.

Substâncias	concentração (µg mL ⁻¹)					IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
	200	100	50	25	12,5	
% de lise*						
OE KC Fo	100±0	99,5±0,7	97,8±1,9	84,8±1,2	73,4±2,5	6,4
OE XA Fr	100±0	100±0	79,6±1,6	68,5±4,2	69,4±7,3	6,4
OE ZRh Fr	100±0	100±0	91,4±1,1	76,6±1,9	65,1±1,1	8,1
OE Z Rh Fo	100±0	100±0	76,2±2,5	31,1±4,4	27,4±2,5	29,5
OE ZRi Fo	100±0	98,5±1,2	90,3±1,2	67,4±2,5	50,3±2,5	13,1

* valores representam a média ± desvio padrão (n= 3)

OE KC Fo = óleo essencial *kielmeyera coriacea* folhas

OE XA Fr = óleo essencial *Xilopia aromática* frutos

OE ZRh Fr = óleo essencial *Zanthoxylum rhoifolium* frutos

OE Z Rh Fo = óleo essencial *Zanthoxylum rhoifolium* folhas

OE ZRi Fo = óleo essencial *Zanthoxylum riedelianum* folhas

Em pesquisa realizada por Borges e colaboradores (2012) com óleos essenciais de plantas do Nordeste Brasileiro, *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum*, *Chenopodium ambrosioides* e *Lippia origanoides*, demonstra que estes possuem valores IC₅₀/24h de 10,3, 11,5, 28,1 e 39,7 µg/mL respectivamente para formas tripomastigotas.

Estudo realizado por Santoro e colaboradores (2007a) com os óleos essenciais de orégano, tomilho e com timol, o principal constituinte de tomilho, em diferentes concentrações em formas epimastigota e tripomastigota revelaram bons resultados tripanocida.

O óleo essencial de erva-cidreira e seu principal constituinte (cital) foi avaliado sobre as três formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*, epimastigota, tripomastigota e amastigotas, e se mostraram eficazes. Para o óleo essencial o IC₅₀ foi de 126,5 e 15,5 µg mL⁻¹ para as formas epimastigota e tripomastigota, respectivamente. Para o citral os IC₅₀ foram de 42 µg mL⁻¹ para a forma epimastigota, 14,2 µg mL⁻¹ para a forma tripomastigota e IC₅₀/48 h (% infecção de macrófagos × número de amastigotas por

célula) de $5,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, com uma forte inibição da proliferação amastigota intracelular. Os resultados mostram que o óleo essencial de erva-cidreira é eficaz contra tripomastigotas e amastigotas, e que o seu componente principal, o citral, é responsável pela atividade tripanocida (SANTORO *et al.*, 2007b).

Cymbopogon citratus (DC) Stapf (Gramineae), mais conhecido como citronella, teve o óleo essencial das folhas avaliado sobre tripomastigotas metacíclica *in vitro* juntamente com o citral, seu constituinte majoritário. O citral apresentou $\text{IC}_{50}/24 \text{ h}$, de $24,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo, portanto considerado um bom candidato à droga antiparasitária para *Trypanosoma cruzi* (CARDOSO & SOARES, 2010)

Investigações feitas com óleo essencial de *Piper cubeba*, identificou como constituinte majoritário o sabineno (19,99%), o mesmo encontrados como constituintes principais nos óleos dos frutos de *X. aromática* (69,72%) e *Z. rhoifolium* (55,94%). No teste tripanocida contra formas tripomastigota *in vitro* isoladas de uma cultura linha celular LLCMK2 com óleo essencial de *Piper cubeba* os resultados foram significativos, apresentando atividade inibitória com valores de IC_{50} de $45,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ESPERANDIM *et al.*, 2013).

A rotundifolona, limoneno e piperitenona, identificados no óleo essencial das folhas de *Lippia pedunculosa*, foram isolados e avaliados quanto à sua atividade tripanocida contra as formas epimastigotas e tripomastigotas. Os resultados se mostraram significativos com IC_{50} inferiores a $34,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os três compostos testados, sendo o rotundifolona o composto mais ativo com um valor de IC_{50} inferior a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas as formas de *Trypanosoma cruzi* (MENEZES *et al.*, 2014).

Os óleos essenciais de folhas de *Xylopiia frutescens* e duas espécies de *Xylopiia laevigata* (XLMC e XLSI) foram avaliados quanto suas atividade tripanocida contra a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, com IC_{50} valores inferiores a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra epimastigotas e tripomastigotas, respectivamente. Além disso, foram capazes de reduzir a percentagem *in vitro* de o número macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi* e a forma amastigotas em concentrações não citotóxicas para macrófagos (DA SILVA *et al.*, 2013).

5.4 Avaliação da atividade citotóxica dos óleos essenciais

Essa avaliação é muito importante uma vez que no ser humano o *Trypanosoma cruzi* sobrevive na corrente sanguínea e se multiplica em células nucleadas. Assim além

de avaliar o efeito dos óleos essenciais no protozoário é necessário que avalie seus efeitos nas células que o abriga para verificar se estas não serão afetadas.

O CC_{50} é a concentração citotóxica ou concentração que leva a lise de 50% do número de células testadas.

Verificou-se com essa avaliação que todos os óleos essenciais não apresentaram toxicidade contra as células de mamíferos em concentrações menores que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 8). Isso implica que todos os óleos essenciais são considerados de baixa citotoxicidade.

Tabela 8: Avaliação da atividade citotóxica dos óleos essenciais.

Substâncias	concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							$CC_{50}(\mu\text{g mL}^{-1})$
	6,25	12,5	25	50	100	200	400	
% células viáveis*								
OE KC Fo	100±0	100±0	100±0	100±0	73,9±1,1	70,9±1,8	25,9±0,9	262,1
OE XA Fr	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	35,6±0,3	392,6
OE ZRh Fr	100±0	100±0	97,1±1,9	88,2±1,1	87,1±1,2	75,8±1,8	39,1±1,5	365,0
OE Z Rh Fo	100±0	100±0	100±0	98,5±0,9	63,1±1,6	56,2±2,1	31,1±1,7	215,9
OE ZRi Fo	100±0	99,1±0,3	95,7±3,2	88,3±1,5	82,7±2,9	80,8±3,5	71,1±1,1	116,3

* valores representam a média ± desvio padrão (n= 3)

OE KC Fo = óleo essencial *kielmeyera coriacea* folhas

OE XA Fr = óleo essencial *Xilopia aromática* frutos

OE ZRh Fr = óleo essencial *Zanthoxylum rhoifolium* frutos

OE Z Rh Fo = óleo essencial *Zanthoxylum rhoifolium* folhas

OE ZRi Fo = óleo essencial *Zanthoxylum riedelianum* folhas

Analisando ainda o trabalho de Borges e colaboradores (2012), observou-se que todos os óleos essenciais por eles estudados apresentaram citotoxicidade em mamíferos em concentrações maiores que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo assim considerados não citotóxicos. Os óleos analisados obtiveram valores de IC_{50} de 617,9, 275,6, 192,7, 175,7, 176,9 e $180,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Vitex agnus-castus*, *Chenopodium ambrosioides*, *Lippia sidoides*, *Lippia organoides*, *Justicia peitorais* e *Ocimum gratissimum*, respectivamente. Já o óleo essencial de tomilho não apresenta citotoxicidade para macrófagos de rato em concentrações pelo menos 1,5-2 vezes maior do que as concentrações de IC_{50} que é de $38 \mu\text{g mL}^{-1}$ para tripomastigotas da corrente sanguínea (SANTORO *et al.*, 2007b).

O índice de sensibilidade (IS) é dado pela razão entre o valor de CC_{50} das células hospedeira (linhagem LLCMK₂) dividido pelo valor IC_{50} do parasita. Segundo Romanha e colaboradores (2010) as substâncias que apresentam IS maiores que 50 são consideradas como bons candidatos a uma nova droga. A Tabela 9 traz os resultados de IS de todos os óleos essenciais analisados, sendo os óleos dos frutos da *Xylopiá aromática* (61,3) e *Zanthoxylum rhoifolium* (45,1) excelentes candidatos a uma investigação na procura de um novo fármaco antiparasitário.

Tabela 9: Atividade tripanocida e citotóxica* e índice de seletividade dos óleos essenciais de *kielmeyera coriácea*, *Xilopia aromática*, *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum riedelianum*.

Óleos essenciais	Tripomastigota IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fibroblasto LLCMK ₂ CC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Índice de Seletividade (IS)
<i>kielmeyera coriácea</i> (folhas)	6,4	262,1	40,9
<i>Xilopia aromática</i> (frutos)	6,4	392,6	61,3
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> (frutos)	8,1	365,0	45,1
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> (folhas)	29,5	215,9	07,3
<i>Zanthoxylum riedelianum</i> (folhas)	13,1	116,3	08,9

6. CONCLUSÃO

Nas análises químicas dos óleos essenciais de cada espécie estudada, o constituinte em maior porcentagem encontrado foi o sabineno no óleo essencial dos frutos da *Xylopiá aromática* (69,72%) e *Zanthoxylum rhoifolium* (55,94%). Já nos óleos essenciais das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium*, *Zanthoxylum riedelianum* e *Kielmeyera coriacea* os constituintes em maior porcentagem encontrados foram β -elemeno (31,26%), γ -elemeno (24,81%) e n-tetradecano (13,46%), respectivamente.

A alta atividade tripanocida associado a baixa citotoxicidade para células de mamíferos dos óleos essenciais das folhas de *Z. riedelianum*, *Z. rhoifolium* e *K coriacea* e dos frutos de *X. aromática* e *Z. rhoifolium*, faz com que todos estes óleos sejam promissores candidatos de drogas antiparasitárias. Entretanto, tomados em conjuntos, os resultados revelaram que os óleos essenciais mais promissores e passíveis de uma investigação mais cuidadosa são os dos frutos da *X. aromática* e *Z. rhoifolium*. Adicionalmente, o sabineno pode ser o responsável por essas propriedades destes óleos essenciais, uma vez que é o composto que está em maior porcentagem nestes. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de morte dos parasitas induzidos pelos óleos essenciais mais promissores e identificação de seus alvos intracelulares, assim como ensaios biológicos *in vivo*. E ainda avaliar o potencial do composto sabineno isolado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatograph mass spectrometry**. 4^o ed Copyright, 2007.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 95, p. 367–373, 2000.

ANDRADE, E. H. A.; SILVA, A. C. M.; MAIA, J. G. S.; CARREIRA, L. M. M.; OLIVEIRA, J. Essential oil composition from leaf, fruit and flower of *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. **J. Essent. Oil Bear. Plants**. v.7, p.151-154, 2004.

ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B.; Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v.30, p.27-35, 1997

AZEREDO, C. M.O.; SOARES, M. J. Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. **Rev. Bras. Farmacog**. v. 23, n. 5, p. 762–768, 2013

AZEREDO, C. M. O.; SANTOS, T. G.; MAIA, B. H. L. N. S.; SOARES, M. J. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. **Compl. Altern. Med**. V.14, p. 309-316, 2014.

BITTRICH, V, Clusiaceae in lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2010.

BOEHME, A. K .; NOLETTO, J. A .; HABER, W. A . Bioactivity and chemical composition of essential oils of *Zanthoxylum leaves rhoifolium* and *Zanthoxylum setulosum* of Monteverde, Costa Rica. **Nat Prod Research**.v. 22, n. 1, p. 31-36, 2008.

BORGES, A. R.; AIRES, J. R. A.; HIGINO, T. M. M.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.LOPES, J. A. D.; FIGUEIREDO, R.C.B. Q. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Exper. Paras.** v. 132, p. 123–128, 2012.

CARDOSO, J.; SOARES, M. J. *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.105, n.8, p. 1026-1032, 2010.

CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **Plant. Jor.** v.66, p.212–229, 2011.

CIMERMA, B; CIMERMAS, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2º edição. Editora Atheneu. 2010.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J.R.; DE CASTRO, S.L.; A critical review of Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 98, p.3–24, 2002.

CHRISTOFOLI, M. Instituto **Efeito dos Óleos Essenciais de *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum riedelianum* em *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotipo B**. Dissertação apresentada ao Departamento de Ciências Agrárias do Federal de Educação, Ciências e Tecnologia Goiana – Campus Rio Verde em fevereiro de 2014.

DA SILVA, S.L.; FIGUEREDO, P.M.S.; YANO, T. Antibacterial and Antifungal Activities of Volatile Oils from *Zanthoxylum rhoifolium* **Leav. Pharmac. Biol.** v.44, p. 657-659, 2006.

DA SILVA, S. L.; FIQUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Leaves. **A. Amazon**. v.37, p. 281-286, 2007.

DA SILVA, T. B.; MENEZES, L. R. A; SAMPAIO, M. F.C. Composição Química e Anti-*Trypanosoma cruzi*: Atividade de óleos essenciais obtidos de folhas de *Xylopi frutescens* e *X. laevigata* (Annonaceae). **Com. Prod. Nat.**..v.8, n. 3, p. 403-406, 2013.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Citol.** v. 86, p. 197-283, 1984.

DIAO, W. R.; PING HU, Q.; FENG, S. S.; LI, W.Q.; XU, J. G. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil from Green Huajiao (*Zanthoxylum schinifolium*) against Selected Food borne Pathogens.

DIAS, M.C. **Estudos taxonômicos do gênero Xylopi L. (Annonaceae) do Brasil extra-amazônico**. Dissertação, Mestrado em Ciências Biológicas, entregue ao Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas1988.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nov.** v. 32, n. 9, p. 2444-2457. 2009.

DIEHL, E. E.; VON POSER, G. L.; HENRIQUES, A. T. **Bioch. Syst. Ecol.** v. 28, p. 275, 2000.

DIMITRI, N. Investments for neglected diseases can be sensitive to the economic goal of pharmaceutical companies. **Drug. Discov. Tod.** . v.17, n.15, p. 818-823, 2012.

DOENÇA DE CHAGAS. Ciclo da Doença de Chagas. **Só biologia.** (<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/DoencadeChagas.php>). Acessado 14/01/2015.

ELHASSAN, I.A.; ELAMIN, E.E.; AYOUB, S.M.H. Characterization of Lipid Compounds of the Dried Fruits of *Xylopi aethiopica* (Dunal) A. Rich Growing in Sudan. **Pakist. J. Nutr.**.. v.8, n.10, p.1592-1595, 2009.

ESCOBAR, P.; LEAL ,S.M.; HERRERA, L.V.;MARTINEZ, J.R.; ESTASHENKO, E. Chemical Compositionand Antiprotozoal Activities of Colobiam *Lippie ssp* Essential Oils and their major components. **Mem. Inst. Osw. Cruz** v 105, n. 2, p.184-190, 2010.

ESPERANDIM, V. R.; FERREIRA, D. S.; REZENDE, K. C. S.; MAGALHÃES, L. G.; SOUZA, J. M.; PAULETTI, P. M.; JANUÁRIO, A. H.; LAURENTZ, R. S.; BASTOS, J.K.; SÍMARO, G. V.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L.A. In Vitro Antiparasitic Activity and Chemical Composition of the Essential Oil Obtained from the Fruits of *Piper cubeba* **Plant. Med.** V.79, p. 1653–1655, 2013.

EZEKWESILI, C.N.; NWODO, O.F.C.; ENEH, F.U.; OGBUNUGAFOR, H.A. Investigation of the chemical composition and biological activity of *Xylopia aethiopica* Dunal (Annonaceae). **Afr. J. Biotech.** v.9, n.43, p.7352-7356, 2010.

FACUNDO, V.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C.; MORAIS, S.M. Essential oil of *Zanthoxylum ekmanii* (Urb.) Alain. Leaves. **J. Essent. Oil.Res.** v. 15, p. 202-207, 2003.

FONSECA, M. C. M. **Crescimento, composição do óleo essencial, teores de óleo essencial e de tanino em *Porpphillum ruderale* Jacq Cassine.** Dissertação de Mestrado em Fitotecnia apresentada á Universidade Federal de Viçosa, MG, 2001.

GALBERTO, J. M .; RODRIGUES, F. F. G .; SILVA, M. R. Chemical composition, antibacterial and larvicidal activities *Zanthoxylum rhoifolium* Lam Fruit Essential Oil. **J.Ess. O Bear. Plan.** v. 11, n. 6, p. 571-576, 2008.

GARCIA CORTEZ, D. A. G.; ABREU FILHO, B. A.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Antibacterial activity of a biphenyl and xanthenes from *Kielmeyera coriacea*. **Pharm. Biol.** v. 40, p. 485-489, 2002.

GARCIA, S.; RAMOS, C.O.; SENRA, J.F. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. **Antim. Agen. Chemoth.** v.49, n.4, p. 1521–1528, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Mediciniais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Revisão. **Quim. Nov.** v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.

GONZAGA, W.A.; WEBER, A.D.; GIACOMELLI, S.R.; SIMIONATTO, E.; DALCOL, I.I.; DESSOY, E.C.M.; MOREL, A.F. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Plant. Med.** v. 8, p. 773-775. 2003.

GUHL, F; RAMÍREZ, J. D. Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia infection. **Infect Genet.** v.20, p. 148-154. 2013.

LEITE, N. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; ALBUQUERQUE, R. S.; BRITO, D. I. V.; LAVOR, A. K. L. S.; ALENCAR, L. B. B.; TINTINO, S. R.; FERREIRA, J. V. A.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; CUNHA, F. A. B.; PINHO, A. I.; COUTINHO, H. D. M. In vitro cytotoxic and antiparasitic activity of caryophyllene and eugenol against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis* **Rev Cub Plant Med** v.18, n. 4, p. 522-528, 2013.

LIMA, L. M.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extracts from *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae) leaves and stem bark **J. Pharm. Pharm.** v. 59, p. 1151-1158, 2007.

LORENZI, H; **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do brasil, vol.1/ Hanri lorenzi.** 6º ed. São Paulo: Instituto Plantarium de Estudo da Flora, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** Ed Plantarum. v.2, 1998.

MAAS, P.; RAINER, H.; LOBÃO, A. **Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

MACHADO, B. F. M.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cad. Acad. Tub.** V.3, p. 105-127, 2011.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, A.C.; OLIVEIRA, J.; CARREIRA, L. M. M.; Araújo, J. S. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopia* species. **Flav. Frag. J.** v.20, p.744-747, 2005.

MARTINS-MELO, F.R.; RAMOS JR., A.N.; ALENCAR, C.H.; LANGE, W.; HEUKELBACH, J. Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas. **Trop. Med. Inter. Heal.** v.17, n. 9, p.1066–1075, 2012.

MENEZES, A.; ROCHA, L.; NUNES, S.N.; MEIRA, C. S. A New Source of (R)-Limonene and Rotundifolone from Leaves of *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae) and their Trypanocidal Properties. **Nat. Prod. Comm.** v. 9, n. 6, p. 737-739, 2014.

MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **J. Ethn.** v.110, p. 165–170, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Ver. S. Públ.** v. 44, n. 1, p. 200-202. 2010.

MUNOZ-SARAIVA, S.G.; HABERLAND, A.; WALLUKAT, G.; SCHIMK, I. Chronic Chagas heart disease – From pathogenesis to treatment regimes. **App. Cardiop. Pathoph.** v. 16, p. 55-81, 2012.

MORAIS L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Hort. Bras.** v. 27, p. 4050-4063, 2009.

MOREL, C. M. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. **Cad. Saú. Públ.** v. 22, n. 8, p.1522-1523, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **J. Imm. Meth.** v.65, p.55-63, 1983

MOURA, N.F.; STRAPAZZON, J.; LORO, F.; MOREL, A.F.; FLACH, A. Composition of the leaf oils of rutaceae: *Zanthoxylum hyemale* A. St. Hill, *Z. rhoifolium* Lam. and *Z. rugosum* A. St. Hill et. Tul. **J. Ess. Oil. Res.** v, 18, p. 4-5. 2006.

MOURA-COSTAA, G. F.; NOCCHIA, S. R.; CEOLEA, L. F.; DE MELLOA, J. C. P.; NAKAMURAA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; TEMPONID, L. G.; UEDA-NAKAMURAA, T. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an

indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. **J. Ethn.** v. 143, n. 2, p. 631–638, 2012.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. Bras. Farmacog.** v. 17, p.108-113, 2007.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bior. Techn.** v. 101, p. 372–378, 2010.

NEVES, D. P; **Parasitologia Humana** - Daved Pereira Neves. 12º edição. Editora Atheneu. p 89-110, 2011.

NOGUEIRA, J. S. C.; MOURÃO, I. B.; DOLABELA, M. G.; SANTOS, C. B.; MELLO, A.; KELECOM, R.; MEXAS, D. ;FEDER, C. P.; FERNANDES, M. S. GONZALEZ. *Zanthoxylum caribaeum* (Rutaceae) essential oil: chemical investigation and biological effects on *Rhodnius prolixus* nymph. **Par. Resear.** v.113, n. 11, p. 4271-4279, 2014.

NUSSENZWEIG, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; FREITAS, J. L. P.; NUSSENZWEIG, R. V.; KLOETZEL, E. Ação de corantes trifenilmetâmicos sobre o *Trypanosoma cruzi* in vitro. Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de chagas por transfusão de sangue. **Hospital**, v. 44, p. 731-744, 1953.

OGBONNIA, S. O.; MBAKA, G.O.; ADEKUNLE, A.; ANYIKA, E.N.; NGBOLADE, O.E.; NWAKAKWA, N. Effect of a poly-herbal formulation, Okudiabet, on alloxan-induced diabetic rats. **Agr. Biol. J. N. Am.** v.1, n. 2, p. 139-145, 2010.

OLIVEIRA, V. B. **Potencial dos frutos de *Xylopiá aromática* (lam.) Mart. (annonaceae) no tratamento de alterações metabólicas, induzidas por dieta em camundongos balb/c.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

OSORIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMENEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIERREZ, D.; PACO, M. A.; GIMENEZ, A.; ROBLEDOS, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae **J. Ethn.** v. 111, p. 630–635, 2007.

PARRON, L. M.; AGUIAR, L. M. S.; DUBOC, E.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; CAMARGO, A. J. A.; AQUINO, F. G. **Cerrado: desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável**. 1ª edição. Embrapa Cerrados. p. 464, 2008.

PEREIRA, S.S.; LOPES, L.S.; MARQUES, R.B.; FIGUEIREDO, K.A.; COSTA, D.A.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C. Antinociceptive effect of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) in models of acute pain in rodents. **J. Ethnoph.** v.129, p. 227–231, 2010.

PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; PINTO, C. A. B. P.; BARBOSA, M. H. P. Resposta à regeneração e crescimento de brotos *in vitro* de *kielmeyera coriacea* quando influenciado por diferentes concentrações dos sais e de sacarose. **Ciê. Rur.** v.26, p. 57-61, 1996.

PIETRO, J. A.; PATINO, O. J.; DELGADO, W.A. Chemical composition, pesticides, and antifungal activity of essential oils fruit three Colombian *Zanthoxylum* species. **Ch. J. Agr. Res.** v. 71, n. 1, p. 73-82, 2011.

PRAKASH, B.; SINGH, P., MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. **Int Jour of Food Microbiology.** v. 153, p.183–191, 2012.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MOREAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos Taninos da Aroeira Preta. **Rev. Árv.** v. 26, p. 485-492, 2002.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet** v.375, p. 1388–1402. 2010.

RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Ed. J. Botan.** v. 60, p. 57–109, 2003.

REY, L. **Parasitologia: Parasitas e Doenças Parasitárias do homem nos Trópicos Ocidentais**. Luiz Rey. 4^o edição. Editora Guanabara Koogan. p. 295-344, 2013.

ROMANHA, A. J.; DE CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J. E.; BUSTAMANTE, J. M.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; ROMERO, L. I.; BAHIA, M. T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S.G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z. A. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem. Inst. Osw. Cruz.** v. 105, p. 233-238, 2010.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L.G. L.; SALGADO, A. P. S. P.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; SOARES, M. J. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Paras. Resear.** v.100, n. 4, p. 783-790, 2007a.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; FREIRE, J. M.; SOARES, M. J. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasit.** v. 134, n.11, p. 1649 -1656, 2007b.

SAUTU, A.; BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C.; DEAGO, J.; CONDIT, R. Classification and ecological relationships of seed dormancy in a seasonal, moist tropical forest, Panama, Central America. **Seed. Scien. Resear.** v.17, n. 2, p.127-140, 2007.

SCHMIDT, T; KHALID, S; ROMANHA, A; ALVES, A; BIAVATTI ,W; BRUN, R; DA COSTA ,F; DE CASTRO, S; FERREIRA, V,F; DE LACERDA, M.V.G; LAGO, J; LEON, L; LOPES ,N; DAS NEVES, R; NIEHUES, M; OGUNGBE, I; POHLIT, A; SCOTTI, M; SETZER,W; SOEIRO, M; STEINDEL, M; TEMPONE,A; The Potential of Secondary Metabolitesnfrom Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases .**Current Med Chem.** v.19, n.14, p.2128-2175, 2012.

SCHMUNIS, G.A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta. Trop.** v.115, p. 14-21, 2010.

SILVA, M.S.; TAVARES, J.F.; QUEIROGA, K.F; AGRA, M;F.; FILHOBRABOSA,J.M. Acalóides e outros constituintes de *Xylopi*a *langsdorffiana* (ANNONACEAE). **Quim. Nov.** v.32, n.6, p.1566-1570, 2009.

SILVA, LL.; PAOLI, AAS. Caracterização morfoanatômica da semente de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam.- Rutaceae. **Ver. Bras. Sem.** v. 22, no. 2, p. 250-256, 2000.

SILVA-SANTOS, A.; Análise Técnica, Econômica e de Tendências da Indústria Brasileira de Óleos Essenciais. **Pap.Virt.** 2002.

SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A. M. S.; BIZZO, H. R.; D'AVILA, L. A.; Participation of the citrus oil industry in Brazilian Trade Balance **Plant. Med.** v. 8, n.4, p.8-13, 2006.

SOBRAL, I. S.; SOUZA-NETA, L.C.; COSTA, G. A. N.; GUEDES, M. L. S.; MARTINS, D.; CRUZ, F. G Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmeyera cuspidata* Saddi, Clusiaceae. **Rev. Bras. Farmacog.** v. 19, p. 686-689, 2009.

SOUZA W. **O parasito e sua interação com os hospedeiros.** In: Brener Z, Andrade ZA, Barral Neto M (orgs) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.88-126, 2000.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopi*a *aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. **J.Chrom.** v. 1025, p.105–113, 2004.

TAO, L.; ZHOU, L.; ZHENG, L.; YAO, M. Elemene displays anticancer ability on laryngeal cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Chem. Pharmacol.*, 58: 24-34. Xiao, J.B.; Chen, X.Q.; Zhang, Y.W.; Jiang, X.Y.; Xu, M. 2006. Cytotoxicity of *Marchantia convoluta* leaf extracts to human liver and lung cancer cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 39, p. 731- 738, 2006.

TIANA, J.; ZENGB, X.; FENGA, Z.; MIAOA, X.; PENGA, X.; WANGC, Y. *Zanthoxylum molle* Rehd. essential oil as a potential natural preservative in management of *Aspergillus flavus*. **J. Agric. F. Chem.** v.61, n. 25, p. 6044–6049, 2013.

VIUDA-MARTOS, M; MOHAMADY, M. A; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; ABD ELRAZIK, K. A; OMER, E. A; PEREZ-ALVAREZ, J. A. In vitro antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. **F. Contr.** v.22, p.1715–1722, 2011.

VAN VOORHIS WC. Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. **Drugs** v.40, p.176-202, 1990.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long term follow-up. **Am. Heart. J.** v.127, p.151-62, 1994

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet n 340, updated March 2014. [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>]. Acessado em outubro, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Model List of Essential Medicines 2013. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/93142/1/EML_18_eng.pdf?ua=1]. Acessado em março, 2015.